

UNIVERSITÉ DE LILLE – NORD DE FRANCE
École Doctorale Biologie-Santé

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité « Biologie Cellulaire et Moléculaire »

Présentée pour obtenir le grade de

Docteur en Sciences de l'Université de Lille – Nord de France

par

Julie BERTHE

Rôle de la protéine immuno-régulatrice PD-L1 sur le métabolisme des cellules tumorales

Soutenue le 7 septembre 2018

Devant le jury composé de :

Pr. Xuefen LE BOURHIS	Présidente
Pr. Daniel OLIVE	Rapporteur
Dr. Nicolas CHAPUIS	Rapporteur
Dr. Ruth RIMOKH	Examinatrice
Dr. Fatima MECHTA-GRIGORIOU	Examinatrice
Pr. Bruno QUESNEL	Co-directeur de thèse
Dr. Sylvie GALIÈGUE-ZOUITINA	Co-directrice de thèse
Dr. Carl Simon SHELLEY	Membre invité

« La phrase la plus excitante à entendre en science, celle qui annonce de nouvelles découvertes, n'est pas eurêka (j'ai trouvé) mais plutôt tiens, c'est marrant ... ».

Isaac Assimov.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse. Le Pr. Xuefen LE BOURHIS, d'avoir accepté de présider ce jury ; le Pr. Daniel OLIVE et le Dr. Nicolas CHAPIUS, qui ont accepté d'en être les rapporteurs ; le Dr. Ruth RIMOKH et le Dr. Fatima MECHTA-GRIGORIOU, ainsi que le Dr. Carl Simon SHELLEY d'avoir accepté d'examiner mes travaux de recherche.

Je remercie particulièrement le Pr. Bruno QUESNEL de m'avoir permis d'intégrer son équipe et accordé sa confiance. Merci de m'avoir laissé m'exprimer en toute autonomie et pour l'opportunité de présenter mon travail lors de plusieurs congrès. Ces incroyables expériences – et probablement mes meilleurs souvenirs de thèse – m'auront donné le goût de présenter en public (ce n'était pas gagné !).

J'aimerais également remercier chaleureusement le Dr. Sylvie GALIÈGUE-ZOUITINA. Merci pour votre grande disponibilité, la rigueur scientifique et la façon de penser que vous avez réussi à m'inculquer durant ces 5 dernières années. Merci pour nos discussions, le partage de vos connaissances et votre expérience. Merci pour votre profonde gentillesse, votre confiance et surtout, pour le grand soutien moral que vous m'avez apporté.

Je remercie tous les membres de mon équipe, anciens et nouveaux, ainsi que le personnel de l'IRCL et du JPARC.

Un merci particulier au Dr. Jérôme KLUZA, pour ses conseils avisés et sa disponibilité. Votre aide nous a beaucoup aidé dans la réalisation de ce travail.

Je souhaiterais également remercier le groupe « métabolisme » (William LAINE, Anne TRIHN, Raeka KHAMARI et Salim DEKIOUK), de m'avoir formée à toutes ces nouvelles expériences, d'avoir répondu avec patience à toutes mes interrogations/questions ainsi que pour leur bonne humeur.

Je remercie énormément Isabelle BRICHE pour son aide en culture, mais aussi et surtout pour nos discussions, son sourire communicatif au quotidien, ainsi que pour son soutien tout au long de cette thèse.

Merci à Hassiba EL BOUZZATI pour sa grande et si précieuse aide pour les manips (vive les Western-blots !), sa gentillesse et son éternel optimisme.

Mille mercis à Céline CARTON, Mélanie LAMBERT, Alexia MOPIN, Adeline BARTHELEMY et Samy JAMBON. Pas besoin d'écrire 15 lignes, vous savez déjà à quel point votre bonne

[Remerciements]

humeur (ou pas !) et notre soutien mutuel m'ont été précieux ces dernières années, un peu plus ces derniers mois, et surtout ces dernières semaines.

Merci à mes voisins de bureau, Xavier THURU, Romain MAGNEZ et Zacharie SEGAOULA pour votre bonne humeur quotidienne, vos blagues (pas toujours drôles il faut le dire) et surtout, pour m'avoir supporté tous les jours. Un merci particulier à Xavier qui m'aura été d'une grande aide pour les expériences de xénogreffe.

Merci aussi à mon ancien voisin de bureau, Nicolas PORET, pour ses bons conseils et pour m'avoir formée lors de mon arrivée.

Je tiens particulièrement à remercier les plateformes BiCeL pour la mise à disposition des moyens techniques nécessaires à la réalisation de mes expériences. Je remercie particulièrement Nathalie JOUY et Emilie FLOQUET pour leur conseils et disponibilité pour la cytométrie en flux, ainsi que Meryem TARDIVEL pour son aide en microscopie confocale. Merci également à Martin FIGEAC et au Dr. Frédéric LEPRÊTRE de la plateforme de génomique de l'Université de Lille pour l'analyse des données du transcriptome.

Enfin, un grand MERCI à mes proches, famille et amis, plus ou moins éloignés, pour leurs encouragements réguliers et leur soutien sans faille. Last but not least, merci à Antoine pour ton soutien au quotidien, ta grande patience et ta présence bienveillante... Merci pour tout !

Rôle de la protéine immuno-régulatrice PD-L1 sur le métabolisme des cellules tumorales

RÉSUMÉ

Lorsque les cellules normales évoluent vers un état néoplasique, elles acquièrent de nombreuses caractéristiques. Par exemple, ces cellules exhibent des voies métaboliques anormales et possèdent la capacité d'échapper à la destruction par les cellules de l'immunité, notamment en exploitant des points de contrôles immunitaires ou « *immune checkpoints* ».

La molécule PD-L1 (*Programmed Death-Ligand 1*) appartient à la famille de protéines immuno-régulatrices B7 et a tout d'abord été décrite comme impliquée dans l'immuno-échappement tumoral suite à son interaction avec PD-1, récepteur exprimé à la surface des lymphocytes T. Associée à un mauvais pronostic, une expression aberrante de PD-L1 est retrouvée dans les hémopathies malignes ainsi que dans de multiples tumeurs solides. De manière intéressante, il a été montré que PD-L1 possède également des fonctions pro-tumorales intrinsèques. En effet, cette protéine joue un rôle dans la prolifération des cellules cancéreuses et leur résistance aux chimiothérapies, sans interagir avec PD-1. Toutefois, les mécanismes moléculaires modulés par PD-L1 et impliqués dans ces fonctions sont encore inconnus. Des voies métaboliques anormales ont été décrites comme pouvant contribuer à la croissance tumorale et la résistance aux thérapies. Ainsi, les objectifs de ma thèse ont été d'explorer le potentiel rôle de la protéine PD-L1 dans le métabolisme des cellules tumorales.

En utilisant la méthode d'édition du génome avec les *Zinc Finger Nucleases*, nous avons invalidé le gène *CD274* codant la protéine PD-L1 dans les cellules cancéreuses de sein MDA-MB-231 et investigué les fonctions métaboliques de cette molécule après surexpression dans ces mêmes cellules. Nous avons observé que PD-L1 induit un *shift* de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse, correspondant à l'effet Warburg. Afin de valider cette reprogrammation métabolique, nous avons analysé le profil métabolique de ces cellules et mis en évidence une élévation des niveaux des intermédiaires de la glycolyse tels que le F-6-P, le F-1,6-P, le GAP, le DHAP, le PEP et le pyruvate dans la lignée surexprimant PD-L1, confirmant nos précédents résultats. D'autre part, et en accord avec nos observations quant à une augmentation de la production de ROS (*Reactive Oxygen Species*), nos données transcriptomiques suggèrent une répression de la voie de réponse au stress oxydatif NRF2 suite à l'expression de PD-L1 et notamment de ses gènes cibles tels que *NQO2*, *GSTM3* et *ABCC2*. En outre, l'analyse *in silico* de bases de données de cohortes de patients atteints de cancer du sein a révélé une corrélation entre l'expression du gène *PD-L1/CD274* et l'expression des gènes de la voie du stress oxydant (*GSTM3* ; *CYBB*) ou des gènes codant les transporteurs de glucose (*SLC2A1/GLUT1* ; *SLC2A3/GLUT3*), ces données supportant nos résultats obtenus *in vitro*. Par ailleurs, le glucose étant

[Résumé]

principalement utilisé par les cellules cancéreuses pour favoriser la biosynthèse de diverses biomolécules nécessaires à la prolifération cellulaire, ces résultats pourraient expliquer la tumorigénicité augmentée dans la lignée surexprimant PD-L1 lors des expériences de xénotransfert de cellules de cancer du sein humain chez des souris *Nude*.

Ainsi, les travaux présentés dans cette thèse mettent en évidence de nouvelles fonctions intrinsèques de PD-L1 promouvant le développement tumoral, suggérant l'utilisation d'agents thérapeutiques inhibant ces mécanismes seraient prometteurs pour le traitement du cancer du sein.

ABSTRACT

Evolving to a neoplastic state, normal cells acquire many characteristics; indeed, tumor cells follow abnormal metabolic pathways and exhibit the ability to avoid immune destruction, partly by exploiting immune checkpoints. Many of these are currently under clinical investigation for new cancer treatments, notably the PD-1/PD-L1 axis.

Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) molecule belongs to the B7 immunoregulatory proteins family and was originally described as mediating tumor immuno-escape through interaction with its receptor PD-1 on T cells. Associated with poor cancer outcome, aberrant PD-L1 expression has been observed in hematologic malignancies and in multiple solid tumor types. Actually, this protein has been shown to regulate tumor cell proliferation and resistance to chemotherapy through apoptosis inhibition, without interacting with PD-1. However, cellular mechanisms modulated by PD-L1 and involved in these functions are still unclear. Abnormal metabolic pathways are known for contributing to tumor growth and therapy resistance; therefore, the objective of my PhD thesis was to investigate the impact of PD-L1 in breast cancer cell metabolic reprogramming.

Using genome editing, we knocked-out the *CD274* gene encoding PD-L1 in breast cancer cell line MDA-MB-231 and investigated metabolic functions after PD-L1 overexpression in the same cells. We observed that PD-L1 induces a shift from oxidative phosphorylation to glycolysis, indicating this molecule promotes the Warburg effect in these tumor cells. To validate PD-L1 metabolic reprogramming, we performed metabolomic profiling that highlighted significantly increased levels of glycolysis intermediated such as F6P, F1,6P, GAP, DHAP, PEP and pyruvate in PD-L1-expressing cells, confirming our latter results. Moreover, in agreement with an increasing mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production, transcriptomic study suggested that PD-L1 represses NRF2-mediated oxidative stress response pathway, especially *NQO2*, *GSTM3* and *ABCC2* genes. Furthermore, in silico analysis of breast cancer patients databases highlighted a correlation between *PD-L1/CD274* gene and oxidative stress gene signature (*GSTM3*; *CYBB*) or glucose transporters genes (*SLC2A1*; *SLC2A3*) expressions, supporting our results. Besides, glucose is mostly used by cancer cells to favor biosynthesis of diverse biomolecules required for cellular proliferation; the above results could explain our human breast cancer cells xenograft experiments in *Nude* mice demonstrating that PD-L1 increases tumorigenicity.

Thus, the work presented in this thesis evidences novel PD-L1 intrinsic tumor-promoting functions, suggesting that therapeutic agents inhibiting these mechanisms would be promising for breast cancer treatment.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	1
LISTE DES FIGURES	6
LISTE DES TABLEAUX	8

INTRODUCTION	10
---------------------------	----

PARTIE 1 : Immuno-évasion des cellules tumorales	10
---	----

1. <u>Immuno-surveillance ou élimination des cellules tumorales</u>	12
1.1. Mise en évidence du phénomène d'immuno-surveillance	12
1.1.1. Arguments expérimentaux chez la souris	12
1.1.2. Arguments épidémiologiques chez l'Homme	13
1.1.3. Arguments cliniques chez l'Homme	13
1.2. La réponse immunitaire anti-tumorale	14
2. <u>La phase d'équilibre ou dormance tumorale</u>	17
3. <u>Immuno-évasion des cellules cancéreuses</u>	18
3.1. Mécanismes d'immuno-échappement	19
3.1.1. Immuno-sélection	19
3.1.1.1. Invisibilité de la cellule tumorale	19
3.1.1.2. Résistance à l'apoptose induite par les CTLs	21
3.1.1.3. Production de molécules immunosuppressives	22
3.1.2. Immuno-subversion	25
3.1.2.1. Les cellules dendritiques (CDs)	25
3.1.2.2. Les lymphocytes T régulateurs (Tregs)	26
3.1.2.3. Les lymphocytes Th17	27
3.1.2.4. Les macrophages associés aux tumeurs (TAM)	28
3.1.2.5. Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC)	28
3.1.2.6. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)	29
3.1.2.7. Les fibroblastes associés au cancer (CAFs)	29
3.2. Les <i>immune checkpoint inhibitors</i>	30
3.2.1. Quelques généralités	30
3.2.2. Cas du récepteur PD-1 (Programmed cell death-1)	33
3.2.2.1. Structure et expression de la protéine PD-1	33
3.2.2.2. Ligands du récepteur PD-1	34
3.2.2.3. Fonctions immuno-suppressives de PD-1	35
3.2.2.4. Mécanismes moléculaires impliqués dans ces fonctions immuno-suppressives	36
4. <u>La famille B7, protéines d'immuno-régulation</u>	37
4.1. Généralités et structure des protéines B7	37
4.2. Description et rôles immunologiques des membres B7	38
4.2.1. Différents groupes de protéines B7	38
4.2.2. La protéine PD-L1 (B7-H1)	41
4.2.2.1. Structure et isoformes protéiques de PD-L1	41
4.2.2.2. Expression de PD-L1 et sa régulation	43
4.2.2.2.1. Expression de PD-L1	43
4.2.2.2.2. Régulation de l'expression de PD-L1	44
4.2.2.3. PD-1 et B7-1, protéines B7 interagissant avec PD-L1	45
4.3. Focalisation sur l'axe PD-L1/PD-1 et son rôle immunitaire	47
4.3.1. Activation de l'immunité	47
4.3.2. PD-L1 et dormance tumorale	48

4.3.3.	PD-L1/PD-1 et Immuno-suppression	49
4.3.3.1.	Notion de « résistance adaptative »	49
4.3.3.2.	Mécanismes impliqués dans cette immuno-suppression	50
4.3.3.2.1.	<i>Apoptose, anergie et épuisement des lymphocytes</i>	51
4.3.3.2.2.	<i>Production d'IL-10</i>	52
4.3.3.2.3.	<i>Inactivation des autres cellules de l'immunité</i>	53
4.3.3.2.4.	<i>Rôle de « bouclier moléculaire »</i>	53
4.3.3.2.5.	<i>Induction de lymphocytes T régulateurs</i>	53
4.3.3.2.6.	<i>Mécanisme de compétition métabolique</i>	54
4.4.	Fonctions non-immunologiques des protéines B7	55
4.4.1.	La croissance tumorale.....	55
4.4.2.	Résistance à la mort cellulaire et aux chimiothérapies.....	56
4.4.3.	Migration, invasion et processus EMT	58
4.4.4.	Métabolisme cellulaire	59
4.5.	Expression de PD-L1 dans le cancer du sein et ciblage de l'axe PD-1/PD-L1 en clinique.....	61
4.5.1.	Expression de PD-L1 et cancer du sein.....	61
4.5.1.1.	Classification des différents sous-types de cancer du sein.....	62
4.5.1.2.	Expression de PD-L1 dans le cancer du sein.....	63
4.5.2.	Ciblage de l'axe PD-1/PD-L1 en clinique	64
4.5.2.1.	Développement d' <i>immune checkpoint inhibitors</i>	64
4.5.2.2.	Combinaison d'anticorps anti-PD-1 avec d'autres inhibiteurs d' <i>immune checkpoint</i>	65
4.5.2.3.	Combinaison d'anticorps anti-PD-1 et d'inhibiteurs de kinases	65
4.5.2.4.	Combinaison d'anti-PD-1 et de chimio-thérapies.....	65

PARTIE 2 : Métabolisme tumoral et régulation du stress oxydatif66

1.	<u>Métabolisme des cellules tumorales</u>	66
1.1.	« Effet Warburg » et production de macromolécules.....	68
1.1.1.	Dérégulation de la consommation de glucose et des voies alternatives.....	68
1.1.1.1.	Catabolisme du glucose ou glycolyse.....	69
1.1.1.2.	Catabolisme de la glutamine	70
1.1.2.	Les réactions anaplérotiques mitochondriales	71
1.1.3.	Acides gras et β -Oxydation mitochondriale.....	74
1.2.	Régulation du métabolisme cellulaire.....	75
1.2.1.	Altérations métaboliques et micro-environnement.....	75
1.2.1.1.	Modulation métabolique des cellules stromales	76
1.2.1.2.	Modulation métabolique des cellules cancéreuses.....	78
1.2.1.3.	Acquisition des nutriments par différents moyens	80
1.2.2.	Altérations géniques : oncogènes et suppresseurs de tumeurs	81
1.2.2.1.	La voie PI3K/AKT/mTOR	82
1.2.2.2.	La voie LKB1/AMPK.....	84
1.2.2.3.	Voie MAPK	84
1.2.2.4.	MYC.....	84
1.2.2.5.	HIF-1 α	86
1.2.2.6.	p53.....	88
1.2.2.7.	RAS	90
1.2.3.	Enzymes métaboliques altérées lors d'un cancer	91
2.	<u>Stress oxydant et métabolisme cellulaire</u>	93
2.1.	Stress oxydatif : définition et origines.....	93
2.1.1.	Production de ROS en conditions physiologiques.....	94
2.1.2.	Production de ROS lors de pathologies tumorales.....	95
2.2.	Conséquences d'un stress oxydatif.....	96

2.2.1.	Composants cellulaires et dommages oxydatifs	96
2.2.1.1.	Dommages à l'ADN et instabilité génique	97
2.2.1.2.	Dommages protéiques	98
2.2.1.3.	Dommages lipidiques.....	98
2.2.2.	Impact du stress oxydatif sur la signalisation cellulaire	98
2.3.	Impact des ROS sur la cancérogénèse.....	99
2.3.1.	ROS et prolifération cellulaire	100
2.3.2.	Stress oxydatif et mort cellulaire	101
2.3.2.1.	Stress oxydant et apoptose.....	101
2.3.2.2.	Stress oxydant et sénescence	102
2.3.2.3.	ROS et chimiorésistance / chimiosensibilité	102
2.3.3.	ROS, processus d'invasion et de métastase.....	102
2.3.4.	Stress oxydatif et reprogrammation métabolique	103
2.3.4.1.	ROS et dérégulations métaboliques.....	103
2.3.4.2.	ROS et hypoxie.....	104
2.4.	Différentes réponses anti-oxydantes.....	106
2.4.1.	<i>La catalase</i>	107
2.4.2.	<i>Les superoxyde dismutases (SOD)</i>	107
2.4.3.	<i>Le système peroxyrédoxine (PRDX)</i>	107
2.4.4.	<i>Le système glutathion (GPX)</i>	107
PARTIE 3 : La voie de signalisation NRF2-KEAP1		110
1.	<u>Le facteur de transcription NRF2</u>	110
2.	<u>KEAP1, senseur et inhibiteur naturel de NRF2</u>	111
2.1.	Structure moléculaire de KEAP1.....	111
2.2.	Mécanisme d'interaction NRF2-KEAP1	112
3.	<u>Séquences <i>Antioxydant Response Element</i> « ARE » et gènes cibles de NRF2</u>	113
3.1.	Les séquences <i>Antioxydant Response Element</i>	113
3.2.	Gènes cibles de NRF2.....	114
3.2.1.	Les enzymes de l'équilibre redox.....	114
3.2.2.	Les enzymes de détoxification de phase II	115
3.2.3.	Les autres gènes régulés par NRF2	116
4.	<u>Mécanismes régulant la voie NRF2-KEAP1</u>	118
4.1.	Le modèle <i>hinge et latch</i>	118
4.2.	Changement conformationnel de KEAP1 et dissociation avec CUL3.....	120
4.3.	Le modèle de conformation cyclique.....	120
4.4.	L'oxydation des cystéines de NRF2	121
4.5.	Modifications post-traductionnelles du complexe NRF2-KEAP1	122
4.5.1.	Phosphorylation de NRF2.....	122
4.5.1.1.	La phase précoce de phosphorylation.....	122
4.5.1.2.	La phase tardive de phosphorylation.....	123
4.5.2.	Phénomènes d'acétylation et désacétylation de NRF2	123
4.5.3.	Ubiquitination de KEAP1.....	124
4.6.	Régulation par les microRNAs	124
4.7.	Régulation indirecte de la voie NRF2-KEAP1	124
4.7.1.	Les protéines partenaires de KEAP1	124
4.7.2.	Protéines partenaires de NRF2.....	126
5.	<u>Implication du facteur NRF2 dans les pathologies cancéreuses</u>	127
5.1.	NRF2, suppresseur de tumeur.....	127
5.2.	Le paradoxe NRF2 : fonctions dépendantes du contexte ?.....	128
5.3.	Oncogène NRF2 et la promotion du cancer	130
5.3.1.	NRF2, stress oxydatif et xénobiotiques.....	131
5.3.1.1.	Protection contre un stress oxydatif	131

5.3.1.2. Protection contre les xénobiotiques et les thérapies anti-tumorales	132
5.3.2. NRF2 et survie des cellules tumorales.....	133
5.3.2.1. Protection contre le mécanisme de mort cellulaire par apoptose.....	133
5.3.2.2. Protection contre le mécanisme de mort cellulaire par autophagie.....	133
5.3.3. Différenciation et prolifération cellulaire	134
5.3.4. NRF2 et reprogrammation métabolique.....	134
5.3.4.1. Métabolisme du glucose	134
5.3.4.1.1. Voie des pentoses phosphates (PPP).....	136
5.3.4.1.2. Voie de glucuronidation	136
5.3.4.1.3. Cycle TCA	137
5.3.4.2. Métabolisme de la glutamine.....	137
5.3.4.3. Métabolisme des lipides.....	138
<u>OBJECTIFS</u>	140
<u>MATÉRIEL ET MÉTHODES</u>	142
1. <u>Techniques de biologie cellulaire</u>	142
1.1. Culture cellulaire et réactifs.....	142
1.1.1. Culture des lignées cellulaires	142
1.1.2. Réactifs et conditions de traitements	142
1.2. Transfection cellulaire	143
1.3. Cytométrie en flux.....	143
2. <u>Techniques de biologie moléculaire</u>	144
2.1. Invalidation de <i>CD274</i> par technique d'édition du génome	144
2.2. Amplification des plasmides.....	145
2.2.1. Transformation bactérienne	145
2.2.2. Isolement et linéarisation des fragments d'ADN.....	145
2.3. Extraction de l'ADN génomique, PCR et séquençage.....	146
2.4. Extraction des ARN, synthèse des ADNc et Q-RT-PCR	146
2.4.1. Extraction des ARN totaux.....	146
2.4.2. Synthèse des ADNc.....	147
2.4.3. Q-RT-PCR.....	147
3. <u>Techniques de biochimie</u>	148
3.1. Extraction et dosage de protéines.....	148
3.2. Western-blot	148
3.3. Immunofluorescence	150
4. <u>Techniques de biologie fonctionnelle</u>	150
4.1. Evaluation de la croissance cellulaire	150
4.1.1. Analyse par comptages	150
4.1.2. Tests de clonogénéité.....	150
4.1.3. Culture 3D	151
4.2. Analyse de l'apoptose.....	151
4.3. Analyse du cycle cellulaire.....	151
4.4. Détermination de la production de ROS.....	152
4.5. Evaluation du métabolisme.....	152
4.5.1. Analyses par méthode <i>Seahorse</i> ®	152
4.5.2. Dosages du glucose et lactate.....	152
5. <u>Manipulations <i>in vivo</i> : Xéno greffe</u>	152
6. <u>Etudes "omics"</u>	153
6.1. Etude métabolomique.....	153
6.2. Analyses du kinome et du transcriptome	153

7. <u>Analyses <i>in silico</i></u>	154
7.1. Recherche de protéines tronquées potentiellement générées après l'édition du génome	154
7.2. Analyses de bases de données de patients atteints de cancer du sein	154
RÉSULTATS	156
PARTIE I. Génération des modèles cellulaires d'étude	156
1. <u>Invalidation de <i>CD274</i> par édition du génome dans les cellules MDA-MB-231</u>	156
1.1. Invalidation du gène <i>CD274</i> et obtention de clones cellulaires <i>KO</i>	156
1.2. Génération des lignées MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 »	160
1.3. Validation des lignées MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 »	161
2. <u>Génération de lignées cellulaires surexprimant l'isoforme 1 de PD-L1</u>	163
CONCLUSION PARTIE I.	166
PARTIE II. Caractérisation phénotypique et transcriptomique de l'impact de PD-L1 dans les cellules tumorales	167
1. <u>Evaluation phénotypique du rôle de PD-L1 dans les cellules tumorales</u>	167
1.1. La protéine PD-L1 module la croissance des cellules MDA-MB-231	167
1.2. PD-L1 favorise la progression tumorale <i>in vivo</i>	169
2. <u>Impact de PD-L1 sur le kinome des cellules MDA-MB-231</u>	171
2.1. Analyse globale du kinome	171
2.2. Validation de la modulation de la phosphorylation de la Serine 6 de p53	172
2.3. Evaluation de l'expression de gènes cibles de p53	175
3. <u>PD-L1 module le transcriptome des cellules MDA-MB-231</u>	177
3.1. Analyse globale avec le logiciel IPA (<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>)	177
3.2. Dérégulation de la voie anti-oxydante NRF2 suite à l'expression de PD-L1	179
CONCLUSION PARTIE II.	184
PARTIE III. Modulation du métabolisme suite à l'expression de PD-L1	185
1. <u>Impact de PD-L1 sur le métabolisme des cellules MDA-MB-231</u>	185
1.1. Etude fonctionnelle du métabolisme	185
1.2. Validation par analyse métabolomique	188
1.2.1. Voie de la glycolyse	188
1.2.2. Production de nucléotides et acides aminés	191
1.3. Lien potentiel entre la modulation du métabolisme par PD-L1 et HIF-1 α ?	192
1.4. Ces différences métaboliques observées <i>in vitro</i> sont-elles présentes <i>in vivo</i> ?	194
2. <u>Etude du rôle de PD-L1 dans d'autres lignées cellulaires</u>	195
3. <u>Analyse <i>in silico</i> de bases de données de patients atteints de cancer du sein</u>	197
3.1. Corrélation entre l'expression de <i>PD-L1/CD274</i> et divers gènes impliqués dans le métabolisme	197
3.2. Elargissement de l'analyse à d'autres membres de la famille B7	198
CONCLUSION PARTIE III.	200
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	202
1. PD-L1, une glycoprotéine pas seulement membranaire	203
2. Croissance cellulaire et tumorigénicité induites par PD-L1 : comparaison avec les données bibliographiques	207
3. La reprogrammation métabolique <i>in vivo</i> induite par PD-L1 prédomine-t-elle sur la diminution de croissance <i>in vitro</i> ?	210

4. D'autres voies de signalisation sont-elles impliquées dans les fonctions métaboliques de PD-L1 observées ?	213
5. Activité intrinsèque de PD-L1, effet de classe ?	217
<u>CONCLUSION GÉNÉRALE</u>	218
<u>RÉFÉRENCES</u>	222
<u>ANNEXES</u>	250
1. Annexe 1 : Carte des vecteurs plasmidiques.....	250
2. Annexe 2 : <i>CompoZR Zinc Finger Nuclease</i> ciblant le gène <i>CD274</i>	251
3. Annexe 3 : Validation des régions <i>OFF-target</i> potentielles des ZFN	253
4. Annexe 4 : Sélection des clones cellulaires MDA-MB-231 ± PD-L1	254
5. Annexe 5 : Liste des gènes différemment exprimés entre les lignées MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 »	255
6. Annexe 6 : Résultats de l'analyse <i>in silico</i> des membres B7	258

LISTE DES ABRÉVIATIONS

¹O₂ : Oxygène singulet
2-FDG : 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose
2-HG : 2-hydroxyglutarate
3-PG : 3-phosphoglycérate
4-HNE : 4-hydroxynonanal
5-FU : 5-Fluorouracile
α-KG : α-Kétoglutarate

A

A5/PSMA5: *Proteasome Subunit Alpha 5*
aa : acide aminé
ABC: *ATP-binding cassette*
ACC : Acétyl-CoA carboxylase
Acétyl-CoA: Acétyl-Coenzyme A
ACL/ACLY : ATP Citrate lyase
ACOX: Acyl-CoA Oxydase
ADCC : *Antibody-Dependant Cell-mediated Cytotoxicity*
ADN: Acide désoxyribonucléique
ADNc: ADN complémentaire
ADNmt: ADN mitochondrial
ADNn: ADN nucléaire
AMP/ADP/ATP: Adénosine mono- bi- tri-phosphate
AMPK : *AMP-Activated Protein Kinase*
Ag-tum : Antigène tumoral
AhR: *Aryl hydrocarbon hydroxylase receptor*
AICD: *Activation-induced cell death*
AKR: Aldo-Kéto réductase
AKT: AKT Sérine/Thréonine Kinase
ALDH : Aldéhyde Déshydrogénase
AP-1: *Activator protein 1*
Ara-C: Cytosine arabinoside
ARE: *Antioxidant Response Element*
ARN: Acide ribonucléique
ARNm: ARN messenger
ASCC : Acétyl-CoA-Synthétases
ASCT2: Alanine-Sérine-Cystéine Transporteur 2
ASK-1: *Apoptosis signal-regulating kinase 1*
ASNS: Asparagine synthétase
ATF4 : *Activating Transcription Factor 4*
ATGL: Adipose triglyceride lipase

B

B7-1/2: Antigène B7-1/2

B7-DC: *B7 Dendritic Cell Molecule*
B7-H1-7: *B7 Homolog 1-7*
B7S1: *B7 Superfamily Member 1*
HHLA2: *HERV-H LTR-Associating 2*
BACH: *BTB And CNC Homolog*
BAX: *BCL2 Associated X*
BCL: *B-cell CLL/Lymphoma*
BCR: *B-cell receptor*
BCR-ABL: *break- point cluster region-Abelson*
BHA: Hydroxyanisole butylé
BMP4: *Bone morphogenic protein 4*
BRAF: BRAF Proto-Oncogène
BRCA1: *Breast Cancer 1*
BTB: *Broad complex Tramtrack and Bric-a-Brac*
BTLA : *B- and T-lymphocyte attenuator*
BTNL2/2A2 : *Butyrophilin Like 2*
BVR: Biliverdine réductase

C

CAD: *carbamoyl phosphate synthetase 2*
CAF: fibroblastes associés au cancer
CAT: Catalase
CAV-1: Cavéoline-1
CBD: *Caveolin-1 Binding Domain*
CBL-B: *Casistas B Lineage Lymphoma*
CBP: *CREB-binding protein*
CCL : *C-C Motif Chemokine Ligand*
CCND3: Cycline D3
CCR : *C-C Motif Chemokine Receptor*
CCRCC : Carcinome rénal métastatique à cellules claires
CDx: *Cluter of differenciation X*
CD28H: *CD28 Homolog*
CD40L: Ligand CD40
CDK6: *Cyclin Dependent Kinase 6*
CDKN2A: *Cyclin Dependent kinase inhibitor 2A*
CDX1: *Caudal type homeobox-1*
CECAM1: *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*
CFU-F : *Colony Forming Units-Fibroblasts*
CK2: Caséine kinase 2
CMH-I/II: Complexe majeur d'histocompatibilité I/II
CMTM4/6: *CKLF Like MARVEL Transmembrane Domain Containing 4/6*

[Liste des abréviations]

c-MYC: MYC Proto-Oncogène
CNC: *Cap 'n' Collar*
CO : Monoxyde de carbone
CO₂ : Dioxyde de carbone
COX-2: Cyclo-oxygénase 2
CPA : Cellule présentatrice de l'antigène
CPNPC: Cancer du poumon non à petites cellules
CPT: Carnitine palmitoyl transérase
CREB: *CAMP Responsive Element Binding*
CRM : Chaîne respiratoire mitochondriale
CSC : Cellule souche cancéreuse
CSD: *Caveolin-1 Scaffolding Domain*
CSF-1: *Colony Stimulating Factor 1*
CSM : Cellule souche mésenchymateuse
c-SRC: SRC Proto-Oncogène
CTL : Lymphocyte T cytotoxique
CTLA-4 : *Cytotoxic T lymphocyte (CTL)-associated antigen 4*
CUL3: *Cullin 3*
CXCL: *CXC-chimiokine ligand*
CXCR4 : *CXC Motif Chemokine Receptor 4*
Cycle TCA: Cycle des acides tricarboxyliques

D

D3T: 1,2-dithiole-3-thione
DC : Cellule dendritique
DC-SIGN: *DC-specific intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin*
DCK: Déoxycytidine kinase
DcR3: *Decoy Receptor 3*
DEM: Diéthyl maléate
DGR: *Double Glycine Repeat/Kelch*
DHAP: Dihydroxyacétone phosphate
DLBCL: *Diffuse large B-cell lymphoma*
DMAT: 2-diméthylamino-4,5,6,7-tétrabromo-1H-benzimidazole
DNMT1: ADN méthyltransférase 1

E

EBV: *Epstein Barr Virus*
EGF: *Epidermal Growth Factor*
EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*
EMT: Transition épithélio-mésenchymateuse
ER: Récepteur aux œstrogènes
ERK: *Extracellular Signal-Regulated Kinase*
ETC: Chaîne de transport d'électrons

F

F-1,6-BP: Fructose-1,6-bisphosphate
F-6-P: Fructose-6-Phosphate
FADH₂: Dihydroflavine-Adénine Dinucléotide
FAK: *Focal Adhesion Kinase*
FAS : *FAS Cell Surface Death Receptor*
FASL : *FAS Ligand*
FASN: *Fatty Acid Synthase*
FDA: *Food and Drug Administration*
FGF: *Fibroblast Growth Factor*
FH: Furamate hydratase
FLIP: *FLICE inhibitory protein*
FOXA1: *Forkhead Box A1*
FOXO3a: *Forkhead Box O3*
FOXP3 : *Forkhead Box P3*
FRET: *Förster Resonance Energy Transfer*
Fru-2,6-BP: Fructose-2,6-bisphosphate

G

G-3-P: Glycéraldéhyde-3-phosphate
G-6-P : Glucose-6-Phosphate
G6PD: Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GAPDH: Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GCL : Glutamate Cystéine Ligase
GDH: Glutamate déshydrogénase
GLS: Glutaminase
GLUT: *Glucose Transporter*
GM-CSF: *Granulocyte Macrophage - Colony Stimulating Factor*
GMP/GDP/GTP: Guanosine mono- bi- tri-phosphate
GPX : Glutathion peroxydase
GR : Glutathion réductase
GSH : Glutathion réduit
GSK3β: Glycogène Synthase Kinase 3β
GSSG : Disulfure de glutathion
GST : Glutathion-S-transférase
GST2A: Sous-unité 2a de la glutathion-S-transférase
GVL : Greffe *Versus* Leucémie

H

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HDAC: Histone Déacétylase
HER2: Facteur de croissance épidermique humain 2
HGF: *Hepatocyte growth factor*

[Liste des abréviations]

HIF-1 α / β -2: *Hypoxia-inducible factor -1alpha / bêta or -2*

HK2: Hexokinase 2

HLA: Antigène leucocytaire humain

HMGB1: *High Mobility Group Protein B1*

HMOX1 : Hème Oxygénase-1

HRE: *Hypoxia Response Element*

HSP32 : *Heat Shock Protein 32*

hTERT: Télomérase humaine

HVEM: *Virus Entry Mediator*

I

IAB: N-iodoacetyl-N-biotinylhexylenediamine

ICOS : *Inducible Costimulator*

ICOS-L: *Inducible T-Cell Costimulator Ligand*

IDH1/2: Isocitrate déshydrogénase 1/2

IDO: Indoléamine 2,3 dioxygénase

IF1 : *ATPase inhibitory factor-1*

IFN- α / β / γ : Interféron alpha / bêta / gamma

Ig V/C: Immunoglobuline Variable / Constant

IKK β : I κ B kinase β

IL-x : Interleukine X

ILT2/4: *Immunoglobulin-like Transcript 2/4*

IMP: Inosine monophosphate

IMPDH1/2: Inosine Monophosphate

Déshydrogénase 1/2

iNOS: *inducible nitric-oxyde synthase*

IRF-1: *Interferon Regulatory Factor-1*

ITIM: *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitor Motif*

ITSM: *Immunoreceptor Tyrosine Switch Motif*

IVR: *InterVening Region*

J

JAK: Janus Kinase

JNK: *c-JUN N-terminal kinase*

K

KAR: *Killer Activating Receptor*

KC: Kératinocytes

KEAP1: *Kelch-line ECH-associated protein 1*

Ki67 : Ki67 Antigène

KIR : *Killer Inhibitory Receptor*

KIR2DL4: *Killer Cell Immunoglobulin Like Receptor, 2lg Domains And Long Cytoplasmic Tail 4*

KO : *Knock-out*

KPNA6: Kayryophérine $\alpha 6$

KRAS: KRAS Proto-Oncogène

L

LAG-3 : *Lymphocyte activation gene 3*

LAM: Leucémie aiguë myéloïde

LC3B-I/II: *Autophagy-Related Protein Light Chain 3 Beta I/II*

LDH-A: Lactate Déshydrogénase A

LKB1 : *Liver Kinase B1*

LOX : Lipoxygénase

LPS : Lipopolysaccharide

LSECtin: *Liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin*

LT / LB : Lymphocyte T / B

Lymphome Bcl1: *B-cell leukemia/lymphoma 1*

M

mAb : anticorps monoclonal

mac: macrophages

MAF: *Musculo-Aponeurotic Fibrosarcoma*

MAOA : Monoamine oxydase A

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*

MARE : *Maf Recognition Element*

MCA: Méthylcholanthrène

MCL1: *Myeloid Cell Leukemia 1*

MCP-1: *Monocyte Chemoattractant Protein-1*

MCT1/4: *Monocarboxylate transporter 1/4*

MDM2: *Mouse Double Minute 2*

MDSC: *Myeloid-derived suppressor cells*

ME1: Enzyme malique 1

MEC: Matrice extracellulaire

MEF : Fibroblaste embryonnaire murin

mEH: Epoxyde hydrolase microsomale

MEK: *Mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase*

MIC-A/B: *MHC Class I Related Sequence A/B*

miR: microARN

MMP-2/9: Métalloprotéinase matricielle -2/9

mo: monocytes

MPC: *Mitochondrial pyruvate carrier*

MRD: *Multi-drug resistance associated protein*

MRP: *Multi-resistance protein*

MTHFD2: *Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase 2*

mTOR: *Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase*

mtTFA: *mitochondrial transcription factor A*

MyD88: *Myeloid Differentiation Primary Response 88*

N

NAC: N-acétyl-cystéine
NAD: Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NANOG: *Nanog Homeobox*
NCR: *Natural Cytotoxicity Receptor*
Neh: *NRF2 ECH Homology*
NES: *Nuclear Export Sequence*
NF-κB: *Nuclear Factor Kappa B*
NK : *Natural Killer*
NKG2: *Natural Killer Group Protein 2*
NKT : *Natural Killer T*
NLS: *Nuclear Localization Sequence*
NO : Oxyde Nitrique
NOTCH1: *Translocation-Associated Notch Protein TAN-1*
NOX : NADPH oxydase
NQO: NADPH-quinone oxydoréductase
NRF2: *Nuclear Factor Erythroid 2 (NF-E2)-related factor 2*
nTregs: Tregs naturels

O

O₂ : Oxygène
O₂⁻ : Anion superoxyde
O₃ : Ozone
OAA : Oxaloacétate
OCT4 : *Octamer-Binding Protein 4*
OH[•] : Radical hydroxyle
ONOO⁻ : Anion Peroxynitrite
OxPHOS : Phosphorylation oxydative

P

P5CS: Pyrroline-5-carboxylate synthase
p66Shc: *p66 Src collagen homolog*
PARK7: *Parkinson protein 7*
PC : Pyruvate carboxylase
pCD: cellules dendritiques plasmacytoïdes
PD-1: *Programmed cell Death-1*
PD-1H: *Programmed cell Death-1 Homolog*
PDCD1: *Programmed cell Death-1*
PDGF: *Platelet Derived Growth Factor*
PDH: Pyruvate déshydrogénase
PDK: Pyruvate Déshydrogénase Kinase

PD-L1/2: *Programmed cell Death Ligand-1/2*
PEP: Phosphoénolpyruvate
PFK : Phospho-fructokinase
PGAM5: Phosphoglycérate mutase 5
PGC1-α: *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*
PGE2 : Prostaglandine E2
PGP: *P-glycoprotein*
PHD1/2: Prolyl hydroxylase 1/2
PHGDH: Phosphoglycérate déshydrogénase
PI3K: Phosphatidyl inositol-3-phosphate kinase
PI-9: *Peptidase Inhibitor 9*
PIAP: *Polyadenylate-binding protein-interacting protein*
PKA/C: Protéine kinase A/C
PKM2: Pyruvate kinase 2
POX: Proline oxydase
PPAT: Amidophosphoribosyl transférase
PPP: Voie des Pentoses Phosphates
PR: Récepteur à la progestérone
PRDX: Peroxyrédoxine
PRPS2: Phosphoribosyl pyrophosphate synthétase 2
p-SMAD1-5: SMAD1/5 phosphorylé
PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*
PYCR1: Pyrroline-5-carboxylate réductase

R

R-5-P: Ribose-5-phosphate
RAS: RAS Proto-oncogène
Rb: Protéine du rétinoblastome
RBX1: *Ring box 1*
RCC: Cancer des cellules rénales
RCS : Espèces réactives du chlorure
REF-1 : *Redox factor 1*
RGMb: Molécule de guidage répulsif membre de la famille b
RISC: *RNA-induced silencing complex*
RNS: Espèces réactives de l'Azote
ROS: Espèces Réactives de l'oxygène
RSS : Espèces réactives du soufre
RTK: Récepteur Tyrosine Kinase
RUNX3: *Runt related transcription factor 3*

S

S5A/PSMD4: *Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 4*

[Liste des abréviations]

SASP: Senescent Activated Secretory Pathway
SCD1: Stéaroyl-CoA désaturase 1
SCO2: Cytochrome C oxidase assembly protein 2
SDH: Succinate déshydrogénase
sh/siRNA: small hairpin / small interfering RNA
sHLA : Antigène leucocytaire humain soluble
SHP-1/2: Src homology 1/2-containing phosphotyrosine phosphatase
SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise
SLC1A5/SLC5A1/SLC7A1: Solute Carrier Family 1/5/7 Member 1/5
SLUG: Snail Family Transcriptional Repressor 2
SN2: System N Transporter 2
SNAIL: Snail Family Transcriptional Repressor 1
SOCS1: Suppressor of cytokine signaling 1
SOD1/2: Superoxyde dismutase 1/2
SOX2 : SRY-Box 2
SQSTM1: Séquestosome 1
SREBP-1: Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1
SSH1L: Slingshot 1L
STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3
STCA: Sulfoxythiocarbamate

T

TALDO1: Transaldolase 1
TAM : Macrophage associé aux tumeurs
TAP: Protéine transporteur des antigènes
t-BHQ: tert-Butylhydroquinone
TCR: T-cell Receptor
TDO2 : Tryptophane-2,3-dioxygénase
TGF- β : Transforming growth factor β
Th1/2/17: Cellules T helper 1/2/17
TIGAR: TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator
TIGIT: T cell ITIM domain
TIL: Lymphocyte T infiltré
TIM-3: T-cell immunoglobulin and mucin protein 3
TIMP-1/2: Tissue inhibitor of metalloproteinase -1/2
TK1: Thymidine kinase
TKT: Transketolase
TLR4: Toll-Like Receptor 4

TLT-2: TREM-Like Transcript 2
TMIGD2: Transmembrane And Immunoglobulin Domain Containing 2
TNBC : Triple Negative Breast Cancer
TNFR : Tumor necrosis factor receptor
TNF- α / β : Tumor necrosis factor alpha / bêta
TP53: Tumor Protein P53
TRAF6: TNF Receptor Associated Factor 6
TRAIL: TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TRE : TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) Response Element
Tregs: Lymphocytes T régulateurs
TRX : Thioredoxine
TRXR : Thioredoxine réductase
TS : Thymidylate synthase
TSLP : Phosphoprotéine stromale thymique
TWIST: Twist Family BHLH Transcription Factor

U

UGT: UDP-glucuronosyl transférase
ULBP1-4: UL16 Binding Protein 1-4
UQCRC1: Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1
UTR: Untranslated Transcribed Region
UVB: Ultra-violets B

V

VEGF: Vascular endothelial growth factor
VHL: Von Hippel-Lindau
VISTA: V-domain Ig suppressor of T-cell activation
VTCN1: V-Set Domain Containing T Cell Activation Inhibitor 1

W

WT: Wild-type

X

XRCC1: X-Ray Repair Cross Complementing 1

Z

ZAP70: 70 KDa Zeta-Associated Protein

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Théorie de l'immuno-édition des tumeurs.	11
Figure 2 : Altération de la présentation d'antigènes et immuno-échappement des cellules tumorales.....	20
Figure 3 : Mécanismes immuno-suppresseurs des lymphocytes T régulateurs.....	27
Figure 4 : Représentation schématique des différentes isoformes protéiques de PD-L1 chez l'Homme.	43
Figure 5 : Interactions PD-1/PD-L1 et PD-L1/B7-1.....	46
Figure 6 : Hypothèse de « résistance adaptative ».	49
Figure 7 : Mécanismes d'immuno-suppression induits par l'axe PD-1/PD-L1 au sein du micro-environnement tumoral.	51
Figure 8 : Phosphorylation oxydative et production d'ATP.	67
Figure 9 : Reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses.	68
Figure 10 : Métabolisme du glucose et synthèse de macromolécules.....	70
Figure 11 : Métabolisme de la glutamine dans les cellules cancéreuses.....	72
Figure 12 : Cellules cancéreuses, acides-gras et β -oxydation.	75
Figure 13 : Modulation métabolique des cellules stromales par le micro-environnement tumoral.	77
Figure 14 : Voies métaboliques des cellules cancéreuses selon les conditions environnementales.	79
Figure 15 : Voie PI3K/AKT/mTOR et métabolisme des cellules tumorales.....	83
Figure 16 : Implication du facteur Myc dans le métabolisme cellulaire.	86
Figure 17 : Conditions de stabilisation et d'activation du facteur HIF-1.	87
Figure 18 : Régulation du métabolisme cellulaire par la protéine p53.	90
Figure 19 : Différentes sources de ROS et conséquences selon leur concentration.	93
Figure 20 : Impact des ROS sur la carcinogénèse.....	100
Figure 21 : Principaux systèmes anti-oxydants.	106
Figure 22 : Structure et domaines fonctionnels de la protéine NRF2.	110
Figure 23 : Structure et domaines fonctionnels de KEAP1.....	112
Figure 24 : Schéma du modèle d'interaction entre les sites de KEAP1 et NRF2.....	113
Figure 25 : Mécanismes de stabilisation de NRF2.	119
Figure 26 : Modèle de conformation cyclique du complexe NRF2-KEAP1.....	121
Figure 27 : Statut de NRF2 et développement tumoral.	129
Figure 28 : Rôle de NRF2 dans les fonctions cellulaires pro-tumorales.	131
Figure 29 : Implication de NRF2 dans le métabolisme du glucose.....	135
Figure 30 : Analyse de l'expression de surface de PD-L1 lors de la mise en place de la technique d'édition du génome.	157
Figure 31 : Mutation du gène CD274 dans les clones cellulaires obtenus et validation de la perte d'expression de PD-L1.	158
Figure 32 : Recherche de codons STOP prématurés au sein des séquences nucléotidiques des clones KO-CD274.....	160
Figure 33 : Validation des lignées MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 » par Western-blot, cytométrie en flux et immunofluorescence.....	162
Figure 34 : Expression de la protéine PD-L1 dans les lignées stables MDA-MB-231, A375, K562 et MCF7.	164
Figure 35 : Analyse par immunofluorescence de l'expression de PD-L1 dans les lignées stables A375, MCF7 et K562.	164
Figure 36 : L'expression de PD-L1 module la croissance des cellules MDA-MB-231.....	168

Figure 37: Survie et prolifération des cellules MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 » <i>in vitro</i> .	169
Figure 38: L'expression de PD-L1 favorise la croissance tumorale <i>in vivo</i> .	170
Figure 39 : Modulation du kinome par la protéine PD-L1.	172
Figure 40: Validation du différentiel de phosphorylation de p53-Ser6.	173
Figure 41: Evaluation de la phosphorylation p53-Ser6 après traitement au tH ₂ O ₂ ou à la NAC.	174
Figure 42: Evaluation de la phosphorylation p53-Ser6 dans les différents modèles cellulaires générés.	175
Figure 43: Expression de gènes cibles de p53 évaluée en Q-RT-PCR.	176
Figure 44: La protéine PD-L1 module l'expression d'effecteurs de la voie NRF2 de réponse au stress oxydant.	180
Figure 45: PD-L1 module la localisation nucléaire du facteur NRF2 et la production de ROS.	183
Figure 46: L'expression de PD-L1 diminue la phosphorylation oxydative des cellules MDA-MB-231.	186
Figure 47: L'expression de PD-L1 augmente la glycolyse des cellules MDA-MB-231.	188
Figure 48: L'expression de PD-L1 module le profil métabolomique des cellules MDA-MB-231.	189
Figure 49: La protéine PD-L1 module les taux de nucléotides et d'acides aminés.	192
Figure 50: L'expression de PD-L1 induit la stabilisation de HIF-1 α en condition mimant l'hypoxie dans les cellules cancéreuses de sein MDA-MB-231.	193
Figure 51: PD-L1 module l'expression de gènes cibles de NRF2 et HIF-1 α <i>in vivo</i> .	194
Figure 52: La surexpression de PD-L1 ne module pas la glycolyse des cellules MCF7 ni des A375.	195
Figure 53: La surexpression de PD-L1 augmente la phosphorylation oxydative des cellules MCF7 et A375.	196
Figure 54: Analyse <i>in silico</i> de cohortes de patients atteints de cancer du sein, confirmant l'effet de PD-L1 sur le métabolisme.	198
Figure 55: Profil d'expression des molécules CD80/B7-1 et CD86/B7-2 dans les cancers du sein et corrélation avec l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme.	199
Figure 56: Conclusion générale, impact de l'expression de PD-L1 sur le métabolisme des cellules MDA-MB-231	220

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Caractéristiques et fonctions principales des cellules de l'immunité innée participant à la réponse anti-tumorale.	15
Tableau 2: Caractéristiques et fonctions principales des cellules de l'immunité adaptative participant à la réponse anti-tumorale.	16
Tableau 3: Caractéristiques et fonctions des molécules immuno-suppressives.	24
Tableau 4: Caractéristiques, patterns d'expression et fonctions des principales protéines co-inhibitrices.	33
Tableau 5: Description et rôles immunologiques des membres des groupes 1, 2, 3 et non classifiés de la famille B7.	41
Tableau 6: Liste de gènes régulés par le facteur NRF2.	117
Tableau 7: Récapitulatif des différentes lignées cellulaires utilisées dans le cadre de ce projet, leur type et origine.	142
Tableau 8: Récapitulatif des conditions de transfection (kit et programmes) et de sélection à la néomycine pour chaque lignée cellulaire.	143
Tableau 9: Récapitulatif des anticorps utilisés pour la cytométrie en flux, leur condition d'utilisation ainsi que le nom du fournisseur.	144
Tableau 10: Récapitulatif des primers sens et anti-sens utilisés lors des réactions de Q-RT-PCR par chimie SYBR Green, pour chaque gène indiqué.	147
Tableau 11: Récapitulatif de l'ensemble des anticorps utilisés dans notre étude.	149
Tableau 12: Top 20 des voies de signalisation affectées par l'expression de PD-L1.	178

INTRODUCTION

INTRODUCTION

PARTIE 1 : Immuno-évasion des cellules tumorales

Le concept d'immuno-surveillance tumorale, énoncé par Paul EHRLICH au début du XX^{ème} siècle puis repris par Frank MACFARLANE BURNETT et Lewis THOMAS en 1957, suggère que le système immunitaire joue un rôle dans le contrôle de la croissance tumorale^{1,2}. Ce concept repose sur différentes observations, dont celles de William B.COOLEY mettant en évidence une corrélation entre la régression de sarcomes osseux et la survenue de sur-infections post-opératoires par un streptocoque pathogène. La réaction inflammatoire secondaire résultant de cette sur-infection contrôlerait la croissance de la tumeur. Ces mécanismes d'immunité anti-tumorale sont complexes et protègent l'organisme contre les infections virales et les agents pathogènes pouvant être à l'origine de cancers viro-induits ou de pathologies inflammatoires favorisant l'oncogénèse². Ces données laissent donc penser que le développement tumoral ferait suite à un déséquilibre entre immunité anti-tumorale et mécanismes d'immuno-échappement.

En 2004, ce concept a été complété par celui de l'immuno-édition et la théorie des 3E proposée par Robert SCHREIBER. Cette dernière stipule que l'interaction entre cellules de l'immunité et cellules tumorales conduit aux phases d'Elimination, d'Equilibre et d'Echappement³ (**Figure 1**).

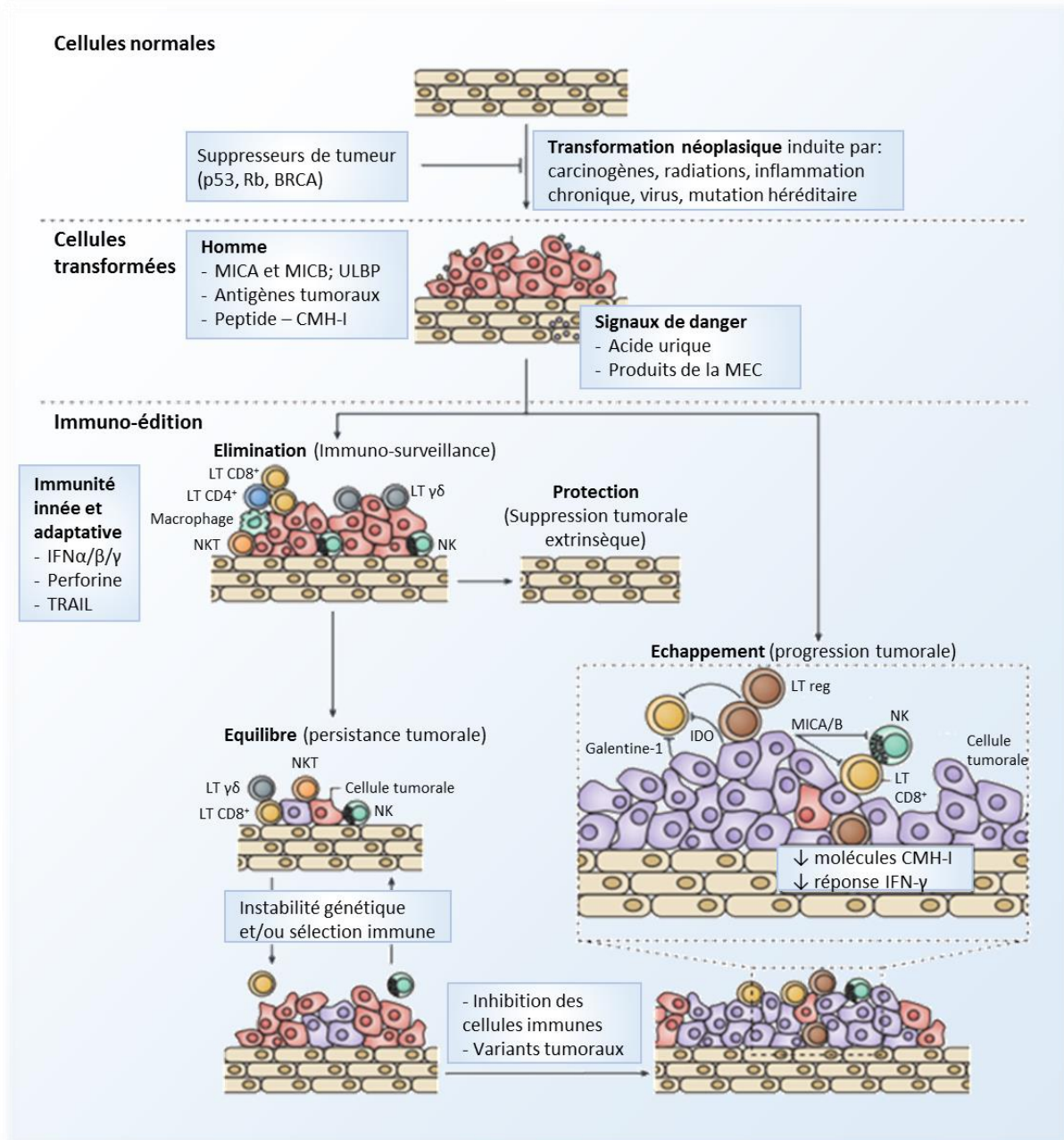


Figure 1 : Théorie de l'immuno-édition des tumeurs.

Le processus d'immuno-édition du cancer est composé de trois phases: *Elimination*, *Equilibre* et *Echappement*. Après transformation néoplasique des cellules normales, les cellules anormales sont reconnues puis détruites par le système immunitaire inné et adaptatif ; on parle de phase d'élimination ou d'immuno-surveillance. Par ailleurs, les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ reconnaissent des antigènes tumoraux ou associés aux tumeurs grâce à leurs molécules CMH (Complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II et de classe I, respectivement, alors que les lymphocytes B produisent des anticorps qui reconnaissent les antigènes tumoraux de surface. Cette reconnaissance par le système immunitaire conduit à la destruction directe des cellules tumorales ainsi qu'à la production de chimiokines et cytokines qui facilitent leur destruction. Si toutes les cellules malignes ne sont pas détruites lors de la phase d'élimination, le processus se poursuit jusqu'à atteindre la phase d'équilibre, subclinique, dans laquelle la tumeur persiste sans croître, du fait de la pression immune. Enfin, la troisième phase, l'échappement, commence lorsque l'équilibre entre réponse immunitaire et tumeur s'oriente en faveur d'une croissance tumorale en raison de l'épuisement ou de l'inhibition immunitaire ou à la suite de l'émergence de variantes de

cellules tumorales. Les cellules transformées non immunogènes entrent directement dans la phase d'échappement. Cette phase se termine par l'apparition de tumeurs cliniquement détectables, à croissance progressive.

BRCA, Breast Cancer; MEC, matrice extracellulaire; IDO, indoleamine 2,3-dioxygénase; IFN, interféron; MIC, MHC-classe-polypeptide-I; NK, Natural Killer; NKT, Natural Killer T; p53, protéine suppresseur de tumeur p53; RAE1, transcription de l'acide rétinoïque précoce 1; Rb, protéine du rétinoblastome; TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand), ligand du récepteur TNFR (Tumor necrosis factor receptor); TReg, Lymphocyte T régulateur CD4⁺ CD25⁺; ULBP, UL16 Binding Protein 1-4. Adapté de ⁴.

1. Immuno-surveillance ou élimination des cellules tumorales

Lors de la phase d'élimination, que l'on peut rapprocher du concept d'immuno-surveillance, les cellules immunes identifient et détruisent les cellules tumorales ^{3,5}. Ce rôle majeur du système immunitaire est appuyé par de nombreux arguments expérimentaux, épidémiologiques mais aussi cliniques ².

1.1. Mise en évidence du phénomène d'immuno-surveillance

1.1.1. Arguments expérimentaux chez la souris

Le concept d'immuno-édition a été mis évidence en comparant l'incidence tumorale suite à l'exposition de souris immuno-compétentes et -déficientes à différents carcinogènes. Ainsi, les souris immuno-déficientes présentent un taux d'apparition de tumeurs accru par rapport aux souris immuno-compétentes. L'immunité anti-tumorale implique la sollicitation coordonnée et séquentielle des systèmes inné et adaptatif. Cela a été démontré dans le cas de souris de type *RAG*^{-/-}, déficientes en lymphocytes B et T matures, qui présentent une fréquence augmentée de tumeurs spontanées et chimio-induites par rapport aux souris sauvages ⁶. De plus, 40% des tumeurs issues des souris *RAG*^{-/-} sont rejetées suite à leur implantation dans les souris immuno-compétentes, alors que la prise de greffe est totale dans les souris *RAG*^{-/-}. De même, 100% des tumeurs issues de souris sauvages se développent dans les souris immuno-déficientes ⁶. Ces données suggèrent que les tumeurs se développant dans des souris immuno-déficientes sont très immunogènes et reconnues par le système immunitaire. A l'inverse, les tumeurs issues de souris sauvages étant faiblement immunogènes, elles ont donc subi une pression de sélection, correspondant au phénomène d'immuno-édition, leur permettant d'échapper à la destruction par les cellules de l'immunité ⁶.

1.1.2. Arguments épidémiologiques chez l'Homme

Dans de nombreuses situations cliniques associées à des déficits immunitaires, l'apparition de certains cancers est fréquemment augmentée². Ainsi, dans le cas d'une ataxie télangiectasie, caractérisée par des anomalies qualitatives et quantitatives des lymphocytes T, l'incidence de développer des lymphomes, leucémies ou la maladie de Hodgkin est plus importante. Un second exemple de pathologie générant un déficit fonctionnel des lymphocytes T est la Trisomie 21, pour laquelle le taux d'incidence des leucémies est vingt fois supérieur à celui d'individus sains². Les cellules de l'immunité innée possèdent également un rôle essentiel dans l'apparition des tumeurs. En effet, dans le cas du syndrome de Chediak-Higashi, à l'origine d'un dysfonctionnement des cellules *Natural Killer* (NK) ou de polymorphismes affectant leur cytotoxicité, il a été montré que le risque de développer certains cancers est plus important que pour une population saine^{2,7}.

Par ailleurs, nous pouvons classer parmi les déficits immunitaires acquis, la pathologie du SIDA (Syndrome d'immunodéficience acquise) ainsi que les transplantations d'organes avec traitement par immuno-suppresseurs. Dans le cas du SIDA non contrôlé, les risques de développer des lymphomes non Hodgkiniens, lymphomes de Burkitt ou cancer de l'utérus lié aux papillomavirus, sont directement liés à l'intensité de l'immuno-suppression ($CD4^+ < 200/mm^3$). Concernant les patients ayant subi une transplantation d'organe et traités par immuno-suppresseurs, l'incidence d'apparition de cancers, tels que des lymphomes non Hodgkiniens, est cent fois plus importante que pour la population générale du même âge. Certains de ces lymphomes régressent spontanément suite à l'arrêt des immuno-suppresseurs. Il est intéressant de noter qu'une partie des patients transplantés développent des cancers de mêmes types histologiques que les cancers présents antérieurement chez les donneurs et considérés comme guéris lors de la transplantation. Ainsi, ces données suggèrent que des cellules tumorales contrôlées par le système immunitaire étaient présentes de manière infra-clinique chez les donneurs, en phase d'équilibre. L'immuno-suppression a ensuite induit l'apparition d'un nouveau cancer à partir de ces cellules chez le receveur².

1.1.3. Arguments cliniques chez l'Homme

Des régressions tumorales spontanées et associées à une réponse immunitaire ont été mises en évidence dans le cas de patients atteints de cancers du rein ou de mélanome. En effet, 1 à 2% de ces patients présentent une réaction lymphocytaire T cytotoxique (CTL) dirigée contre les cellules tumorales². Il existe ainsi une corrélation entre la présence d'un infiltrat immunitaire, notamment par des lymphocytes T (LT), et un pronostic favorable. Les

LT sont considérés comme témoins de la détection et de l'élimination de cellules anormales. De manière générale, le système immunitaire intra-tumoral constitue un nouveau type de biomarqueur, complémentaire des marqueurs protéiques directement associés à la cellule cancéreuse². Par exemple dans le cas du cancer du colon, la présence dans le micro-environnement tumoral de molécules activatrices des LT est corrélée à une meilleure survie et un risque métastatique diminué⁸. Enfin, les allogreffes de moelle allogénique non déplétée en LT du donneur sont associées à une diminution du risque de rechute leucémique, par rapport aux allogreffes déplétées. On parle d'effet GVL, Greffon *Versus* Leucémie. Les CTL du donneur exerceraient un effet anti-leucémique réduisant ainsi le risque de récurrence².

1.2. La réponse immunitaire anti-tumorale

L'immuno-surveillance tumorale se base sur la reconnaissance d'antigènes tumoraux par les cellules de l'immunité. Au début des années 1990, l'équipe de Thierry BOON a identifié et caractérisé au niveau moléculaire le premier antigène tumoral chez l'Homme. Par la suite, des centaines d'antigènes cancéreux reconnus par le système immunitaire ont été isolés^{3,5}. Ces antigènes pouvant également être exprimés par les cellules normales, la réponse immune anti-tumorale peut alors s'accompagner d'une réponse auto-immune. L'immunité anti-tumorale implique une sollicitation séquentielle et coordonnée des systèmes de l'immunité innée et adaptative². Les cellules de l'immunité innée, pré-existantes et antérieures à l'activation d'une immunité adaptative spécifique, interviennent en première ligne et ciblent des récepteurs relativement invariants. Son action se fait par le biais d'effecteurs immédiatement activables, dont les principaux sont les *Natural Killer* (NK), les lymphocytes NKT (*Natural Killer T*) et les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) telles que les cellules dendritiques (DCs), les monocytes (mo) et les macrophages (mac). Toutefois, cette immunité innée n'est pas suffisamment efficace pour permettre l'éradication ou le contrôle des cellules tumorales. Les cellules du système adaptatif sont donc recrutées afin de constituer une deuxième ligne de défense anti-tumorale, caractérisée par l'expansion et la différenciation de lymphocytes spécifiques de l'antigène : les lymphocytes T (LT) CD4⁺, CD8⁺ et les lymphocytes B (LB).

Les caractéristiques et différentes fonctions des cellules participant à l'immunité anti-tumorale innée et adaptative sont résumées dans les **Tableaux 1** et **2**, respectivement.

IMMUNITÉ INNÉE ANTI-TUMORALE

NATURAL KILLER	Caractéristiques :			
	<ul style="list-style-type: none"> - Représentent 5 à 15% des cellules du sang périphérique - Activés par cytokines IFN-α, IFN-β, TNF-α (<i>Tumor necrosis factor alpha</i>) et IL-12 - Engagement aspécifique d'un antigène (Ag) - Système de récepteurs activateurs (activité cytotoxique) et inhibiteurs (tolérance) 			
	Mécanismes d'activation des NK :			
NATURAL KILLER	<p>« Missing self recognition »^{9,10}</p> <ul style="list-style-type: none"> - Récepteurs inhibiteurs des NK :^{9,10} <ul style="list-style-type: none"> ▪ Immunoglobulines : <ul style="list-style-type: none"> KIR (<i>Killer Inhibitory Receptors</i>) ILT (<i>Immunoglobulin-like Transcript</i>) ▪ Lectines de type C : CD94/NKG2A (<i>Natural Killer Group Protein 2</i>) - Ligands de ces récepteurs : CMH-I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité)¹¹ ⇒ ↘ expression des molécules CMH-I à la surface des cellules tumorales = ↘ cytotoxicité NK 	<p>« Induced-self recognition »^{12,13}</p> <ul style="list-style-type: none"> - Récepteurs activateurs des NK : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Immunoglobulines : <ul style="list-style-type: none"> KAR (<i>Killer Activating Receptors</i>) ▪ NCR (<i>Natural Cytotoxicity Receptors</i>) ▪ Lectines C : CD94/NKG2C, NKG2D - Ligands : protéines de stress ⇒ ↗ expression des ligands à la surface des cellules tumorales = ↗ cytotoxicité NK 		
	Mécanismes de lyse des cellules cibles :			
	<ul style="list-style-type: none"> - Libération de granules cytotoxiques (puis apoptose des cellules cibles par les récepteurs de mort) - Sécrétion de cytokines et chimiokines : recrutement et activation des macrophages, DCs et LT¹⁴ 			
Rôles dans l'immunité anti-tumorale :				
<p>⇒ Infiltration tumorale par NK corrélée à un meilleur pronostic¹⁵</p>				
	<p>Lyse des cellules tumorales CMH-I-déficientes^{10,13}</p>	<p>Activation des CPAs par captation d'antigènes tumoraux</p> <p>Déclenchement de l'immunité adaptative¹⁶</p>	<p>Sécrétion de cytokines pro-inflammatoires <i>IFN-γ et TNF-α</i></p> <p>Activation des DCs¹⁵</p>	
NKT	<ul style="list-style-type: none"> - Sous-population de LT exprimant des marqueurs de cellules NK (ex : CD161) - Rôles directs dans les réponses innée et adaptative anti-tumorales : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Permettent l'activation des DCs¹⁷ ▪ Participent à l'effet anti-tumoral de l'IL-12^{18,19} ▪ Cytotoxicité directe dépendante de la voie perforine-granzyme^{20,21} 			
	CPA			
CPA	<ul style="list-style-type: none"> - Cellules dendritiques, macrophages et LB. <ul style="list-style-type: none"> - Présentent des peptides exogènes à l'aide des molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) et induisent l'immunité adaptative²² ▪ Expression de molécules du CMH-II : activation des LT CD4⁺ spécifiques^{23,24} ▪ Expression de molécules du CMH-I : activation des LT CD8⁺²⁵ = processus de « cross-presentation » 			
	<p>Cellules dendritiques = Cellules présentatrices d'antigène dites « professionnelles »</p> <ul style="list-style-type: none"> - Localisées au niveau des tissus périphériques - Activent les LT naïfs²² - Réponse anti-tumorale ou immuno-suppressive selon les cytokines sécrétées et le contexte cellulaire. <ul style="list-style-type: none"> ▪ Activation des DCs par de l'acide urique, des antigènes associés aux tumeurs ou des protéines libérées par cellules tumorales apoptotiques : favorise l'activation des CTLs et le rejet tumoral^{26,27} ▪ Corrélation positive entre la densité des DCs au sein de la tumeur et la présence de CTLs²⁸ 			

Tableau 1: Caractéristiques et fonctions principales des cellules de l'immunité innée participant à la réponse anti-tumorale.

IMMUNITÉ ADAPTATIVE ANTI-TUMORALE

LYMPHOCYTES T CD8⁺	<p style="text-align: center;">Mécanisme d'activation des LT CD8⁺ :</p> <p>1- Interaction du complexe CMH-I-antigène (cellules tumorales) et TCR (<i>T-cell Receptor</i>) (LT) 2- Second signal délivré par des molécules de co-stimulation (famille B7) : permet la formation d'une synapse immunologique stable nécessaire à l'obtention de LT fonctionnels ²⁵ 3- Capacité à lyser les cellules cancéreuses</p> <p>- Infiltration tumorale lymphocytaire : facteur de bon pronostic ^{29,30,31} - Effet cytotoxique LT CD8⁺ = fonction principale du système immunitaire adaptatif anti-tumoral ^{29,30}</p> <p style="text-align: center;">Mécanismes d'élimination des cellules cancéreuses :</p> <p>Activés selon contexte et pouvant agir de concert ^{29,30}</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%; vertical-align: top;"> <p style="text-align: center;">Libération de granules cytotoxiques</p> <p>Perforine, Granzymes A / B Granulysine</p> <p>⇒ Apoptose des cellules cibles ³²</p> </td> <td style="width: 33%; vertical-align: top;"> <p style="text-align: center;">Induction voie apoptotique FAS/FASL ^{32,33}</p> </td> <td style="width: 33%; vertical-align: top;"> <p style="text-align: center;">Sécrétion de cytokines (IFN-γ, TNF-α et TNF-β)</p> <p>- ↗ expression CMH-I à la surface des cellules tumorales: améliore la reconnaissance Ag-tum (antigène tumoral) par CTLs ^{22,34,35,36,37} - Inhibition de la prolifération des cellules tumorales - Induction de l'apoptose des cellules tumorales ³⁸ - Inhibition de l'angiogénèse tumorale ³⁹ - Activation des macrophages ^{40,41}</p> </td> </tr> </table>					<p style="text-align: center;">Libération de granules cytotoxiques</p> <p>Perforine, Granzymes A / B Granulysine</p> <p>⇒ Apoptose des cellules cibles ³²</p>	<p style="text-align: center;">Induction voie apoptotique FAS/FASL ^{32,33}</p>	<p style="text-align: center;">Sécrétion de cytokines (IFN-γ, TNF-α et TNF-β)</p> <p>- ↗ expression CMH-I à la surface des cellules tumorales: améliore la reconnaissance Ag-tum (antigène tumoral) par CTLs ^{22,34,35,36,37} - Inhibition de la prolifération des cellules tumorales - Induction de l'apoptose des cellules tumorales ³⁸ - Inhibition de l'angiogénèse tumorale ³⁹ - Activation des macrophages ^{40,41}</p>		
<p style="text-align: center;">Libération de granules cytotoxiques</p> <p>Perforine, Granzymes A / B Granulysine</p> <p>⇒ Apoptose des cellules cibles ³²</p>	<p style="text-align: center;">Induction voie apoptotique FAS/FASL ^{32,33}</p>	<p style="text-align: center;">Sécrétion de cytokines (IFN-γ, TNF-α et TNF-β)</p> <p>- ↗ expression CMH-I à la surface des cellules tumorales: améliore la reconnaissance Ag-tum (antigène tumoral) par CTLs ^{22,34,35,36,37} - Inhibition de la prolifération des cellules tumorales - Induction de l'apoptose des cellules tumorales ³⁸ - Inhibition de l'angiogénèse tumorale ³⁹ - Activation des macrophages ^{40,41}</p>								
LYMPHOCYTES T CD4⁺	<p style="text-align: center;">Différentes sous-populations de LT CD4⁺ : ^{42,43}</p> <p>- Sécrétion de l'IFN-γ et de l'IL-2 : induit différenciation des LT CD4⁺ en un phénotype « Th1 » - Sécrétion de l'IL-4 : favorise le phénotype « Th2 » - Sécrétion de l'IL-17 : favorise le phénotype « Th17 » - T régulateurs</p> <p style="text-align: center;">Effet anti-tumoral des LT CD4⁺ Th1 :</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 15%; vertical-align: top;"> <p style="text-align: center;">Sécrétion de cytokines</p> <p>IFN-γ, IL-2, TNF-α et TGF-β (<i>Transforming growth factor β</i>) Activation et persistance des CTLs ^{42,44,45}</p> </td> <td style="width: 15%; vertical-align: top;"> <p style="text-align: center;">Expression de molécules de co-stimulation</p> <p>CD27 ou CD134 Activation CTLs</p> </td> <td style="width: 15%; vertical-align: top;"> <p style="text-align: center;">Activation des CPAs</p> <p>Initiation réponse CD8⁺ par voie CMH-I ^{42,46}</p> </td> <td style="width: 15%; vertical-align: top;"> <p style="text-align: center;">Recrutement et activation macrophages, éosinophiles ^{47,48} et LB ^{42,43}</p> </td> <td style="width: 40%; vertical-align: top;"> <p style="text-align: center;">Cytotoxicité directe par voies apoptotiques</p> <p>FAS/FASL ^{42,43} TRAIL (<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>) ⁴⁹ Perforine granzymes ⁵⁰</p> </td> </tr> </table> <p>⇒ Dans les modèles murins LT CD8⁺, LB- et NK- déficients, la présence de LT CD4⁺ est suffisante pour inhiber prolifération cellules cancéreuses et induire leur lyse ^{51,52}</p> <p style="text-align: center;">Rôle pro-tumoral des LT CD4⁺ Tregs, Th2 et Th17 : ^{42,43}</p> <p>- Th17: induisent la résistance des cellules cancéreuses et favorisent l'angiogénèse - Th2: contribuent à la croissance tumorale et sécrètent des cytokines IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 et TGF-β. Mais permettent l'immunité humorale (activation LB et induction production d'anticorps) ainsi que l'activation des mastocytes et éosinophiles ^{42,43} - Tregs: effet immuno-suppresseur suite à la sécrétion d'IL-10 et TGF-β ^{53,54}</p>					<p style="text-align: center;">Sécrétion de cytokines</p> <p>IFN-γ, IL-2, TNF-α et TGF-β (<i>Transforming growth factor β</i>) Activation et persistance des CTLs ^{42,44,45}</p>	<p style="text-align: center;">Expression de molécules de co-stimulation</p> <p>CD27 ou CD134 Activation CTLs</p>	<p style="text-align: center;">Activation des CPAs</p> <p>Initiation réponse CD8⁺ par voie CMH-I ^{42,46}</p>	<p style="text-align: center;">Recrutement et activation macrophages, éosinophiles ^{47,48} et LB ^{42,43}</p>	<p style="text-align: center;">Cytotoxicité directe par voies apoptotiques</p> <p>FAS/FASL ^{42,43} TRAIL (<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>) ⁴⁹ Perforine granzymes ⁵⁰</p>
<p style="text-align: center;">Sécrétion de cytokines</p> <p>IFN-γ, IL-2, TNF-α et TGF-β (<i>Transforming growth factor β</i>) Activation et persistance des CTLs ^{42,44,45}</p>	<p style="text-align: center;">Expression de molécules de co-stimulation</p> <p>CD27 ou CD134 Activation CTLs</p>	<p style="text-align: center;">Activation des CPAs</p> <p>Initiation réponse CD8⁺ par voie CMH-I ^{42,46}</p>	<p style="text-align: center;">Recrutement et activation macrophages, éosinophiles ^{47,48} et LB ^{42,43}</p>	<p style="text-align: center;">Cytotoxicité directe par voies apoptotiques</p> <p>FAS/FASL ^{42,43} TRAIL (<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>) ⁴⁹ Perforine granzymes ⁵⁰</p>						
LYMPHOCYTES B	<p>- Rôle de la réponse anti-tumorale humorale naturelle pas clairement établi. - Les anticorps induisent la lyse des cellules tumorales par : <ul style="list-style-type: none"> ▪ La voie classique du Complément ▪ Mécanisme ADCC (<i>Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity</i>) - Depuis le début du XX^{ème} siècle, utilisation et efficacité en clinique d'anticorps thérapeutiques : Par exemple, le Trastuzumab (anti-HER2/Neu ; Herceptin®), le Cetuximab (anti-EGFR (<i>Epidermal growth factor receptor</i>) ; Erbitux®), le Rituximab (anti-CD20 ; Mabthera®) et le Bévaccizumab (anti-VEGF (<i>Vascular endothelial growth factor</i>) ; Avastin®)</p>									

Tableau 2: Caractéristiques et fonctions principales des cellules de l'immunité adaptative participant à la réponse anti-tumorale.

2. La phase d'équilibre ou dormance tumorale

Le système immunitaire est une barrière contre la formation et la progression tumorale. Il empêche et éradique le développement de néoplasies, tumeurs de haut grade et les micro-métastases. Toutefois, les cellules cancéreuses peuvent développer des mécanismes afin de se soustraire au système immunitaire et ainsi de prévenir leur détection et leur élimination⁵⁵. Les cellules tumorales et celles de l'immunité entrent alors dans un état d'équilibre dynamique, autrement appelé dormance tumorale. Cette phase se caractérise par une barrière immune contrôlant la croissance de la tumeur sans l'éradiquer totalement et une absence de néoangiogénèse⁵⁶. Elle empêche la lésion cancéreuse de s'étendre au-delà d'une certaine taille, la rendant cliniquement invisible et indétectable⁵⁷. Lors de cette période de latence, les effecteurs de la réponse immune sélectionnent les cellules tumorales qui acquièrent des mutations, les rendant plus agressives. Ces cellules résistantes vont être responsables de la phase d'échappement ou d'immuno-évasion, et du développement d'une maladie cliniquement décelable⁵⁷. Cette phase d'équilibre peut notamment expliquer les cas de cancers considérés comme guéris chez des individus donneurs et se développant pourtant à nouveau suite à une greffe chez un individu traité par des immuno-suppresseurs. On peut supposer qu'un tel traitement favorise la sortie de l'état de dormance tumorale⁵⁷. D'autre part, l'injection de faibles doses du carcinogène méthylcholanthrène (MCA) induit le développement de tumeurs non-symptomatiques, l'immunité maintenant les lésions primaires cancéreuses dans un état d'équilibre. Plusieurs mois après l'administration de ce carcinogène, une déplétion en cellules de l'immunité adaptative (LT CD4⁺ et CD8⁺), ou le blocage des cytokines IFN- γ et IL-12 conduit à une croissance rapide de sarcomes au niveau du site d'injection. En revanche, une déplétion en cellules de l'immunité innée NK n'entraîne pas de progression tumorale⁵⁸. L'immunité adaptative semble donc responsable de cette phase d'équilibre.

De nombreux modèles de dormance tumorale existent. Un des plus anciens est celui du lymphome Bcl1 (*B-cell leukemia/lymphoma 1*). Dans ce système, les souris sont immunisées par vaccination anti-idiotypique (anticorps anti-immunoglobuline de ce lymphome) puis injectées avec des cellules Bcl1. Environ 70% des souris développent un lymphome dormant. Les cellules tumorales sont détectées dans la rate. Cet état d'équilibre a une durée moyenne de plus de deux ans et l'apparition de tumeurs décelables est aléatoire⁵⁹. Un second modèle a été développé, en exposant des souris déficientes en *Casitas B Lineage Lymphoma* (Cbl-b) aux ultra-violets afin d'engendrer l'apparition de tumeurs cutanées⁶⁰. Notre laboratoire a également généré un modèle de dormance à partir de cellules leucémiques murines DA1-3b exprimant la protéine de fusion Bcr-Abl (*break-point cluster region-Abelson*), après vaccination préalable des souris syngéniques⁶¹.

Suite à cette longue période de latence, des cellules cancéreuses dormantes peuvent s'affranchir de cet état d'équilibre avec le système immunitaire et engendrer une nouvelle progression tumorale ⁵⁷. Cela correspond à la phase d'immuno-évasion.

3. Immuno-évasion des cellules cancéreuses

Lors des trois différentes étapes du développement tumoral – l'induction, la progression et l'invasion – la signature moléculaire de surface des cellules anormales est altérée quantitativement et qualitativement, favorisant l'acquisition de nouveaux antigènes tumoraux et induisant un état inflammatoire ^{3,5}. Si ce dernier est dans un premier temps en faveur d'une immunité anti-tumorale, un équilibre entre système immunitaire et cellules tumorales peut s'installer et donner lieu à une pression de sélection immune et stromale (par les fibroblastes, cellules endothéliales, cellules immunes et progéniteurs) ^{57,62}. Par conséquent, les cellules cancéreuses acquièrent la capacité d'échapper à la reconnaissance par les cellules de l'immunité, d'inhiber leurs fonctions effectrices et de résister à la mort induite par ces cellules ^{3,5}. Toutefois, la progression et l'invasion tumorale peuvent être engendrées suite à une inflammation chronique ²⁵. Des études épidémiologiques ont montré qu'une prise régulière d'anti-inflammatoires, tels que des inhibiteurs de la cyclo-oxygénase-2 (COX-2) ou de l'aspirine, induit une inhibition chronique de l'inflammation chez des patients atteints de maladies pré-cancéreuses ou pré-disposés au cancer et diminue leur risque d'en développer ⁶³. Ainsi, des patients ayant une inflammation chronique auraient un risque accru de développer une tumeur ⁶⁴. Cela peut s'expliquer par le fait qu'un état inflammatoire attire des cellules favorables au développement tumoral, par exemple des cellules immuno-suppressives (lymphocytes T régulateurs, cellules myéloïdes suppressives), qui inhibent les fonctions des CTLs ou induisent leur anergie suite à des stimulations répétées ²⁵. L'échec du système immunitaire dans le contrôle et l'élimination des cellules cancéreuses correspond à la phase d'immuno-échappement tumorale.

Les cellules malignes échappent à l'immuno-surveillance par deux mécanismes distincts. Celui de l'immuno-sélection correspond à la sélection de variants tumoraux non-immunogènes après pression de sélection, capables de résister à la réponse immune anti-tumorale. A l'inverse, le mécanisme d'immuno-subversion concerne l'induction de la tolérance du système immunitaire vis-à-vis de la tumeur ⁵.

3.1. Mécanismes d'immuno-échappement

3.1.1. Immuno-sélection

Plusieurs stratégies amplifiées lors de la progression tumorale empêchent la reconnaissance des cellules cancéreuses par le système immunitaire, et permettent l'acquisition d'un phénotype malin et agressif^{3,5}. Aussi, les cellules tumorales peuvent altérer leur présentation d'antigènes de surface, les rendant invisibles pour les cellules du système immunitaire (figure 2). Elles peuvent également développer des mécanismes de résistance à l'apoptose induite par les cellules de l'immunité, et sécréter des molécules immuno-suppressives engendrant un défaut d'activation lymphocytaire^{3,5}.

3.1.1.1. Invisibilité de la cellule tumorale

La reconnaissance du complexe CMH-antigène par le TCR (*T-cell Receptor*) nécessitant une quantité suffisante d'antigène, l'acquisition lors de la croissance tumorale de mutations favorisant la perte ou la diminution de l'expression d'antigènes tumoraux⁶⁵ rend les cellules malignes indétectables par les LT CD8⁺ spécifiques⁵. Ce mécanisme, aussi appelé « *Antigenic drift* », permet donc l'immuno-échappement des cellules cancéreuses^{5,66}. Un défaut dans les voies de présentation des antigènes tumoraux peut également être impliqué dans cette invisibilité tumorale (**Figure 2**). L'exemple le plus décrit est celui de la perte partielle ou complète de l'expression des molécules de CMH-I, qui entrave la reconnaissance de ces cellules par les LT CD8⁺ et entraîne la progression tumorale^{67,68}. Ce phénomène a été observé dans des cas de lymphomes B, de cancers du colon, du sein et est corrélé à un mauvais pronostic⁶⁹. Plusieurs mécanismes sont liés à cette perte d'expression : outre la perte d'hétérozygotie des gènes codants les molécules de CMH-I, est retrouvée une perte d'expression du gène codant la β 2-microglobuline, protéine indispensable pour la formation et l'expression des molécules CMH-I⁶⁸. De plus, une diminution de l'expression de gènes codants des protéines TAP (Protéine transporteur des antigènes) impliquées dans l'apprêtement des antigènes, a été décrite⁶⁸.

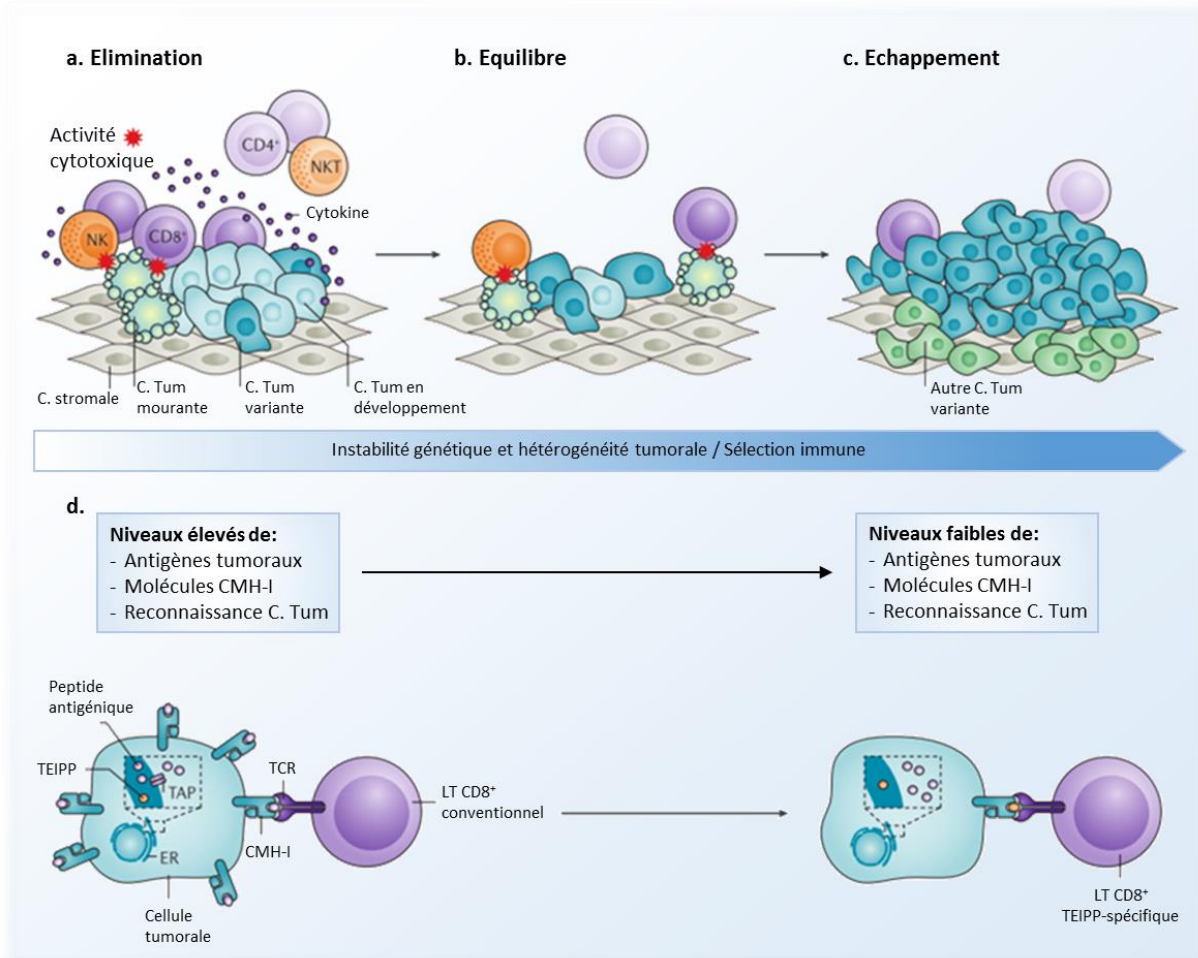


Figure 2 : Altération de la présentation d'antigènes et immuno-échappement des cellules tumorales.

Lors du processus d'immuno-édition, l'instabilité génétique et l'hétérogénéité tumorale augmentent alors que se produit parallèlement une sélection immune des variants de cellules cancéreuses. Dans la première phase, l'élimination (a), le système immunitaire contrôle le développement de la tumeur en détruisant les cellules anormales. Lors de la deuxième phase d'équilibre (b), apparaissent des variants tumoraux ayant une capacité accrue à survivre à une attaque immunitaire, de sorte que dans la troisième phase d'échappement (c), la tumeur échappe au contrôle immunitaire et davantage de variants tumoraux se développent. Cette dernière phase est caractérisée par de multiples mécanismes permettant à la tumeur d'éviter la reconnaissance immune et entraînant une immunosuppression active dans le micro-environnement. En effet, si les cellules tumorales expriment lors de la première phase des niveaux élevés de molécules du CMH et des antigènes tumoraux reconnus par les cellules T CD8⁺ conventionnelles (d), ces taux se trouvent diminués dans les phases ultérieures. Cela provoque une réduction de la reconnaissance et de l'éradication des cellules tumorales par ces cellules T. Cependant, lors de la phase d'échappement, un nouvel ensemble d'antigènes tumoraux apparaît : les TEIPP (T-cell Epitopes associated with Impaired Peptide Processing), peptides altérés uniquement présentés par des cellules malignes et pouvant être reconnus par des cellules T CD8⁺ spécifiques induites par vaccin. En résulterait une réponse immune efficace conduisant au rejet de la tumeur malgré une faible expression des molécules CMH.

ER, réticulum endoplasmique; NK, natural killer; NKT, natural killer T; TAP, protéine transporteur des antigènes; TCR, récepteur des cellules T. Adapté de ⁷⁰.

Les tumeurs peuvent également devenir invisibles pour les cellules de l'immunité innée en perdant l'expression de ligands activateurs des cellules NK ⁷¹. De plus, et comme vu précédemment, les NK peuvent être activés par le mécanisme de « *missing self recognition* » : une perte totale d'expression des molécules CMH-I à la surface des cellules cancéreuses induirait donc leur destruction par les NK. L'altération de l'expression de ces molécules par les cellules malignes est donc finement régulée. Le plus souvent, cette perte d'expression est partielle et caractérisée par une diminution de la présentation d'un ou plusieurs épitopes dominants, ce qui permet de conserver l'aptitude des cellules cancéreuses à stimuler les récepteurs inhibiteurs des NK, et en conséquence, empêcher leur activation ⁷².

Ce mécanisme d'altération de la présentation d'antigènes permet donc d'inhiber la lyse des cellules tumorales par les NK et abolit leur immunogénicité à l'égard des LT CD8⁺ ⁷².

3.1.1.2. Résistance à l'apoptose induite par les CTLs

Les cellules tumorales sont capables de développer des mécanismes de résistance à l'apoptose induite par les cellules de l'immunité et notamment par les CTLs. Ces dernières entraînent la mort de leurs cellules cibles par la voie des récepteurs de mort ou par une cytotoxicité médiée par exocytose de granules lytiques.

Les voies FAS/FAS ligand et des récepteurs TRAIL (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*) sont les plus documentées dans le cas de résistance des cellules tumorales à la lyse par les CTLs. En effet, un défaut de la voie FAS/FAS ligand permet aux cellules malignes de résister de façon directe à l'apoptose induite par les CTLs, mais aussi de façon indirecte en provoquant à leur tour la mort de ces cellules immunitaires. Le récepteur FAS a un rôle suppresseur de tumeur. Aussi, dans de nombreux cancers, son expression est altérée et retrouvée diminuée ou sous forme mutée inactive ⁷³. Par ailleurs, les cellules tumorales mettent en place la stratégie du « leurre ». Elles neutralisent les ligands FASL exprimés à la surface des cellules effectrices à l'aide de molécules solubles sécrétées telles que sDC95 et DcR3 (*Decoy Receptor 3*), sans transmettre de signal de mort ⁷³. Les ligands ne pouvant donc plus interagir avec les récepteurs tumoraux FAS, la survie des cellules cancéreuses est ainsi permise. L'expression de DcR3 est par exemple retrouvée dans des cas de cancers du colon et poumon ⁷⁴, de gliomes malins ⁷⁵ ainsi que chez 25% des patients atteints de cancer gastrique, et est corrélée à une survie plus courte ⁷⁶.

Les cellules malignes peuvent également induire l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que FLIP (*FLICE inhibitory protein*), la survivine ⁷⁷ et des membres de la famille Bcl-2 (*B-cell CLL/Lymphoma 2*) ⁷⁸. A l'inverse, l'expression de protéines pro-apoptotiques serait diminuée, notamment celle de la molécule BAX (*BCL2 Associated X*) ⁷⁹. Si nous prenons

l'exemple de la protéine FLIP, son expression par des cellules cancéreuses murines est responsable de l'inactivité des CTLs contre ces cellules *in vivo*, en dépit de l'activité de la voie perforine/granzyme⁸⁰. L'expression de ces protéines par les cellules tumorales favorise donc leur résistance à l'apoptose induite par FAS et donc l'immuno-échappement.

De manière intéressante, l'expression de FASL à la surface des cellules malignes induit la mort des cellules T et participe à la résistance de la tumeur envers cette immunité adaptative. En effet, la surexpression de FASL dans la majorité des cancers est corrélée à une diminution du taux de lymphocytes infiltrés (TILs) dont le niveau d'apoptose est augmenté, contrairement aux tumeurs n'exprimant pas FASL^{81,82}. Ainsi, des cellules de mélanome surexprimant FASL engendrent une apoptose massive des TILs péri-tumoraux *in vivo*, alors que l'utilisation d'anticorps anti-FASL inhibe cet effet apoptotique *in vitro*⁸³. Il est à noter que la surexpression de FASL par certaines tumeurs peut favoriser le rejet de greffes⁸⁴.

De façon similaire à la voie FAS/FASL, les récepteurs de mort TRAIL et leurs ligands ont une expression dérégulée dans certaines tumeurs⁸⁵. Dans le cas de cancers colorectaux, par exemple, l'expression des récepteurs TRAIL est associée à un haut grade tumoral ainsi qu'à un taux de TILs diminué, et dont l'index apoptotique est inversement corrélé à leur nombre⁸⁶. D'autre part, au cours de la progression maligne, l'expression tumorale des récepteurs TRAIL diminue au profit d'une expression lymphocytaire CD8⁺. L'effet inverse est observé pour leurs ligands⁸⁶.

Outre le phénomène d'immuno-échappement tumoral dû à une dérégulation des voies des récepteurs de mort, les cellules cancéreuses développent des mécanismes de résistance à la voie perforine/granzyme. En effet, des cellules de cancers du colon, du sein et de mélanome peuvent surexprimer une protéine inhibitrice des granzymes B, PI-9 (*Peptidase Inhibitor 9*), dont l'expression est corrélée à une inhibition de la lyse des cellules tumorales par les CTLs *in vitro* et *in vivo*⁸⁷. Toutefois, dans le cas de cellules de lymphome, cette lyse par les CTLs reste fonctionnelle malgré l'expression de PI-9, suggérant l'implication d'autres protéines cytotoxiques (granulysine et granzyme A)⁸⁸. D'autre part, l'absence de liaison de la perforine aux cellules de leucémie aiguë myéloïde (LAM) ML-2 induit leur résistance à la lyse médiée par les NK⁸⁹.

3.1.1.3. Production de molécules immunosuppressives

Le troisième mécanisme d'immuno-sélection correspond à la sécrétion de molécules immuno-suppressives par les cellules tumorales, contribuant à leur immuno-évasion. De nombreuses protéines sont libérées, dont le TGF- β (*Transforming growth factor- β*), le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), l'IL-10 (Interleukine-10), l'IDO (Indoléamine 2,3

dioxygénase), des ligands de NKG2D, l'HLA-G (Antigène leucocytaire humain de type G), des galectines, la PGE2 (Prostaglandine E2) et le couple PD-1/PD-L1 (*Programmed Cell Death (ligand)-1*). Leurs caractéristiques et fonctions sont résumées dans le **Tableau 3** ci-dessous.

	CARACTÉRISTIQUES	FONCTIONS
IL-10	<ul style="list-style-type: none"> - Interleukine - Présente dans le micro-environnement tumoral; - Taux élevés dans les biopsies et le sérum de patients ⁹⁰. 	<ul style="list-style-type: none"> - Régule l'inflammation lors d'infections par des micro-organismes ⁹¹. - Immuno-évasion tumorale : <p><i>Inhibe l'activation et les fonctions des macrophages et DCs</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ↳ présentation des antigènes tumoraux aux CTLs ^{92,93} <p><i>Supprime les activités CTL et LT CD4⁺ Th1</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Inhibe leur prolifération et la sécrétion de cytokines IL-2, IFN-γ et TNF-α ⁹⁰. <p>↳ <i>expression CMH-I à la surface des cellules cancéreuses</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Perte de reconnaissance par CTLs ⁹⁴
LIGANDS DE NKG2D	<ul style="list-style-type: none"> - MIC-A/B (<i>MHC Class I Related Sequence A/B</i>) et ULBP1-4 (<i>UL16 Binding Protein 1-4</i>) : Ligands du récepteur NKG2D (sur NK et LT) - Surexprimés à la surface des cellules stressées ou tumorales 	<ul style="list-style-type: none"> - Engendrent une activité cytotoxique ⁹⁵. - Immuno-évasion tumorale : Clivage protéolytique de ces protéines de surface : empêche leur reconnaissance par les NK et LT ⁹⁵. - Taux sérique des formes solubles corrélé au grade tumoral et facteur de mauvais pronostic ^{96, 97, 98}.
IDO	<ul style="list-style-type: none"> - Enzyme cytosolique - Induite par le médiateur inflammatoire IFN-γ - Retrouvée au niveau des cellules tumorales et stromales ^{99,100}. 	<ul style="list-style-type: none"> - Corrélée à un mauvais pronostic ^{99,100}. - Permet le catabolisme du tryptophane (acide-aminé essentiel à la prolifération des LT) par la voie de la kynurénine ⁹⁹. - Rôle immuno-suppressif : <p><i>Différenciation des LT CD4⁺ en Tregs</i> ⁹⁹</p> <ul style="list-style-type: none"> ↳ <i>expression des récepteurs activateurs NK</i> ¹⁰¹ <i>Déplétion du micro-environnement en tryptophane</i> ↳ prolifération et ↗ mort des LT
VEGF	<ul style="list-style-type: none"> - Facteur de croissance - Sécrété par les cellules tumorales 	<ul style="list-style-type: none"> - Empêche la maturation des CPAs : Inhibition de la reconnaissance et destruction des cellules malignes ¹⁰².
HLA-G	<ul style="list-style-type: none"> - CMH-I non classiques. - Isoformes membranaires (HLA-G 1-4) et solubles (sHLA-G 5-7) ¹⁰³. - Induites par IFN-γ, IL-10, HIF-1α (<i>hypoxia inducible factor 1α</i>) et kynurénine - Tissus tumoraux, sérum et ascites de patients ¹⁰⁴. 	<ul style="list-style-type: none"> - Promeut l'immuno-évasion tumorale : ¹⁰⁵ ↳ <i>cytotoxicité NK et LT CD4⁺ et CD8⁺</i> - Les formes membranaires interagissent avec les récepteurs inhibiteurs ILT2 et ILT4 (<i>Immunoglobulin-like Transcript</i>), p49 et KIR2DL4 (<i>Killer Cell Immunoglobulin Like Receptor, 2Ig Domains And Long Cytoplasmic Tail 4</i>)¹⁰⁴ - Les formes solubles se lient au co-récepteur CD8 et aux récepteurs inhibiteurs ¹⁰⁴ <p><i>Conversion des LT en Tregs et tolérance des DCs</i> ^{103,104}</p>

<p>GALECTINES</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Lectines solubles - Expression dérégulée dans les cancers - Corrélées à un phénotype agressif ¹⁰⁶. 	<ul style="list-style-type: none"> - Survie, prolifération, migration et invasion des cellules cancéreuses. - Angiogénèse tumorale. - Phénomène d'immuno-évasion : ¹⁰⁶ <ul style="list-style-type: none"> ▪ Modèle mélanome murin : Galectine-1 inhibe l'activation et la prolifération des LT et provoque leur mort par apoptose ¹⁰⁶. ▪ Galectine-3 : bloque la transduction du signal induit par TCR et supprime l'activation des LT ¹⁰⁶. 						
<p>TGF-B</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Facteur de croissance - Sécrété par les cellules stromales et tumorales, notamment au niveau du front d'invasion de la tumeur 	<ul style="list-style-type: none"> - Homéostasie tissulaire : régulation prolifération, différenciation, survie, adhésion et migration cellulaire ¹⁰⁷. - Fonctions dépendantes du type et contexte cellulaire : ¹⁰⁷ <ul style="list-style-type: none"> ▪ Initiation tumorigénèse : suppresseur de tumeur ▪ Développement malin lorsque altération de la voie - Suppresseur de tumeur / Activation des cellules T : <table border="1" data-bbox="582 616 1386 795"> <tr> <td data-bbox="582 616 853 795"> <i>↗ Prolifération des LT CD8⁺ ¹⁰⁸</i> </td> <td data-bbox="853 616 1125 795"> <i>Protection des LT CD8⁺ et CD4⁺ envers l'AICD (Activation-induced cell death) ^{108,109}</i> </td> <td data-bbox="1125 616 1386 795"> <i>Différenciation des précurseurs LT CD4⁺ en CD4⁺ effecteurs mémoires (Th1 ou Th2) ¹¹⁰</i> </td> </tr> </table> - Rôle pro-tumoral : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Pro-angiogénique. ▪ Immuno-évasion tumorale : <table border="1" data-bbox="582 907 1386 1355"> <tr> <td data-bbox="582 907 853 1355"> <i>↘ prolifération, survie, différenciation et activité des CTLs ^{107,111}</i> <i>--</i> <i>↘ molécules effectrices (perforine, granzymes, IFN-γ et FASL) :</i> <i>Inhibition de la lyse des cellules tumorales ¹⁰⁷</i> </td> <td data-bbox="853 907 1125 1355"> <i>↘ différenciation LT CD4⁺ en phénotype Th1/2</i> <i>Empêche l'acquisition des fonctions helper ^{107,111}</i> <i>--</i> <i>↗ différenciation des CD4⁺ en Tregs in vitro ¹⁰⁷</i> <i>Résultats inverses in vivo ^{112,113}</i> </td> <td data-bbox="1125 907 1386 1355"> <i>↗ motilité et recrutement des CPAs (mo, mac, NK, DCs) mais ↘ leur activation et fonctions effectrices ¹¹¹</i> <i>--</i> <i>↗ résistance des cellules tumorales à la lyse par CTLs car ↗ expression B7-H3 et B7-H4 (B7 homolog 3/4) en surface ¹¹⁴</i> </td> </tr> </table> 	<i>↗ Prolifération des LT CD8⁺ ¹⁰⁸</i>	<i>Protection des LT CD8⁺ et CD4⁺ envers l'AICD (Activation-induced cell death) ^{108,109}</i>	<i>Différenciation des précurseurs LT CD4⁺ en CD4⁺ effecteurs mémoires (Th1 ou Th2) ¹¹⁰</i>	<i>↘ prolifération, survie, différenciation et activité des CTLs ^{107,111}</i> <i>--</i> <i>↘ molécules effectrices (perforine, granzymes, IFN-γ et FASL) :</i> <i>Inhibition de la lyse des cellules tumorales ¹⁰⁷</i>	<i>↘ différenciation LT CD4⁺ en phénotype Th1/2</i> <i>Empêche l'acquisition des fonctions helper ^{107,111}</i> <i>--</i> <i>↗ différenciation des CD4⁺ en Tregs in vitro ¹⁰⁷</i> <i>Résultats inverses in vivo ^{112,113}</i>	<i>↗ motilité et recrutement des CPAs (mo, mac, NK, DCs) mais ↘ leur activation et fonctions effectrices ¹¹¹</i> <i>--</i> <i>↗ résistance des cellules tumorales à la lyse par CTLs car ↗ expression B7-H3 et B7-H4 (B7 homolog 3/4) en surface ¹¹⁴</i>
<i>↗ Prolifération des LT CD8⁺ ¹⁰⁸</i>	<i>Protection des LT CD8⁺ et CD4⁺ envers l'AICD (Activation-induced cell death) ^{108,109}</i>	<i>Différenciation des précurseurs LT CD4⁺ en CD4⁺ effecteurs mémoires (Th1 ou Th2) ¹¹⁰</i>						
<i>↘ prolifération, survie, différenciation et activité des CTLs ^{107,111}</i> <i>--</i> <i>↘ molécules effectrices (perforine, granzymes, IFN-γ et FASL) :</i> <i>Inhibition de la lyse des cellules tumorales ¹⁰⁷</i>	<i>↘ différenciation LT CD4⁺ en phénotype Th1/2</i> <i>Empêche l'acquisition des fonctions helper ^{107,111}</i> <i>--</i> <i>↗ différenciation des CD4⁺ en Tregs in vitro ¹⁰⁷</i> <i>Résultats inverses in vivo ^{112,113}</i>	<i>↗ motilité et recrutement des CPAs (mo, mac, NK, DCs) mais ↘ leur activation et fonctions effectrices ¹¹¹</i> <i>--</i> <i>↗ résistance des cellules tumorales à la lyse par CTLs car ↗ expression B7-H3 et B7-H4 (B7 homolog 3/4) en surface ¹¹⁴</i>						
<p>PGE2</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Famille eicosanoïdes (composés lipidiques) - Surexpression cancers 	<ul style="list-style-type: none"> - Synthétisée par l'enzyme cyclo-oxygénase-2 (COX-2) ^{115,116} - Corrélée à la progression tumorale avec phénotype invasif. - Inhibe les réponses immunes anti-tumorales : ¹¹⁶ <table border="1" data-bbox="582 1489 1386 1758"> <tr> <td data-bbox="582 1489 710 1758"> <i>Inhibe la différenciation, maturation et activation des DCs ¹¹⁶</i> </td> <td data-bbox="710 1489 949 1758"> <i>↘ prolifération et fonctions cytotoxiques des LT CD4⁺ et CD8⁺ ^{117,118}</i> <i>--</i> <i>↗ différenciation des LT CD4⁺ en Th2 et Tregs ¹¹⁸</i> </td> <td data-bbox="949 1489 1189 1758"> <i>↘ activité phagocytose des macrophages en modulant la sécrétion des cytokines ¹¹⁵</i> </td> <td data-bbox="1189 1489 1386 1758"> <i>↘ prolifération et des fonctions cytotoxiques des NK (↘ production IFN-γ) ¹¹⁵</i> </td> </tr> </table> 	<i>Inhibe la différenciation, maturation et activation des DCs ¹¹⁶</i>	<i>↘ prolifération et fonctions cytotoxiques des LT CD4⁺ et CD8⁺ ^{117,118}</i> <i>--</i> <i>↗ différenciation des LT CD4⁺ en Th2 et Tregs ¹¹⁸</i>	<i>↘ activité phagocytose des macrophages en modulant la sécrétion des cytokines ¹¹⁵</i>	<i>↘ prolifération et des fonctions cytotoxiques des NK (↘ production IFN-γ) ¹¹⁵</i>		
<i>Inhibe la différenciation, maturation et activation des DCs ¹¹⁶</i>	<i>↘ prolifération et fonctions cytotoxiques des LT CD4⁺ et CD8⁺ ^{117,118}</i> <i>--</i> <i>↗ différenciation des LT CD4⁺ en Th2 et Tregs ¹¹⁸</i>	<i>↘ activité phagocytose des macrophages en modulant la sécrétion des cytokines ¹¹⁵</i>	<i>↘ prolifération et des fonctions cytotoxiques des NK (↘ production IFN-γ) ¹¹⁵</i>					
<p>PD-1 PD-L1/2</p>	<ul style="list-style-type: none"> - PD-1 exprimée par les cellules immunitaires. - Ses ligands PD-L1 et PD-L2 : surexprimés dans les tumeurs. 	<ul style="list-style-type: none"> - PD-1 abolit la prolifération et les réponses effectrices des LT suite à son engagement avec ses ligands ¹¹⁹ - Axe associé à pronostic défavorable ^{119,120} - Ex : cancers ovariens, corrélation inverse entre expression PD-L1 et nombre de TILs CD8⁺ ¹²¹ <p>L'axe PD-1/PD-L1 et ses fonctions seront plus détaillés par la suite.</p>						

Tableau 3: Caractéristiques et fonctions des molécules immuno-suppressives.

En d'autres termes, les cellules tumorales échappent à la destruction par les cellules de l'immunité anti-tumorale en développant diverses stratégies : elles peuvent moduler l'expression de récepteurs de surface, induire des mécanismes de résistance à la lyse médiée par les cellules immunes et sécréter un grand nombre de molécules immuno-suppressives. Cela correspond au phénomène d'immuno-sélection, dû à la pression de sélection exercée par le micro-environnement tumoral. Toutefois, les tumeurs utilisent un second processus d'immuno-évasion qu'est l'immuno-subversion^{122,71}.

3.1.2. Immuno-subversion

L'immuno-subversion correspond à une modulation de l'activité des cellules de l'immunité (telles que les cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes T CD4⁺ Th2 et Th17, Tregs, cellules myéloïdes suppressives), mais aussi au recrutement de cellules immuno-suppressives au sein du micro-environnement tumoral (cellules souches mésenchymateuses, fibroblastes associés aux tumeurs). Ce mécanisme favorise ainsi une tolérance spécifique envers la tumeur et met en jeu des phénomènes de coopération inter-cellulaires complexes.

3.1.2.1. Les cellules dendritiques (CDs)

Les patients atteints de cancers ont un nombre diminué de cellules dendritiques circulantes, de phénotype immature et dont les capacités activatrices des lymphocytes sont réduites¹²³. On parle de cellules dendritiques plasmacytoïdes (pCDs), souvent associées à un pronostic défavorable¹²⁴. Les pCDs, activées par l'interleukine-3 (IL-3) et le ligand CD40 (CD40L), favorisent la différenciation des LT CD4⁺ et CD8⁺ naïfs respectivement en cellules T *helper* 2 (Th2) et Tregs produisant de l'IL-10. La sécrétion de TGF- β par ces CDs immatures permet également d'attirer les Tregs au niveau du site tumoral¹²⁵. D'autre part, les pCDs régulent l'activation des lymphocytes T en exprimant l'enzyme IDO¹⁰⁰ et la stimulation répétée de lymphocytes T naïfs par ces pCDs conduit à la production d'IL-10 et l'anergie des LT⁷¹. Enfin, l'expression de molécules de co-stimulation des cellules T (par exemple CD80/B7-1 et CD86/B7-2) à la surface des CDs immatures peut être diminuée^{122,125}.

De plus, des cytokines et dérivés lipidiques sécrétés par les cellules cancéreuses inhibent la réponse anti-tumorale médiée par les CDs, en perturbant leur migration vers les ganglions lymphatiques et provoquant un défaut de différenciation de ces cellules¹²⁵. Le VEGF, l'IL-6 et l'IL-10 sont impliqués dans ces effets immuno-suppresseurs. Par exemple, le VEGF est retrouvé en concentrations élevées dans des sérums de patients ; l'injection d'anticorps anti-

VEGF dans des souris restaure les fonctions préalablement altérées des cellules dendritiques ¹²⁵.

3.1.2.2. Les lymphocytes T régulateurs (Tregs)

Les Tregs correspondent aux lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺ exprimant le facteur de transcription FOXP3 (*Forkhead Box P3*) et représentent 5 à 10% des cellules CD4⁺ du sang périphérique. Chez les patients atteints de cancers, les Tregs sont retrouvés au sein des TILs et à de plus fortes concentrations dans le sang ¹²⁶. Leur accumulation, favorisée par des molécules sécrétées par les cellules tumorales (TGF- β , PGE2 et IDO), est par ailleurs associée au grade tumoral et à un mauvais pronostic lié à une diminution de la réponse immune anti-tumorale ¹²⁷. De manière intéressante, dans le modèle murin de mélanome B16/BL6, l'utilisation d'anticorps anti-CD25 permet l'élimination des Tregs, une diminution de la croissance tumorale ainsi qu'une augmentation du taux de rejet des tumeurs *in vivo* ¹²⁸. Les fonctions immuno-régulatrices des Tregs sont essentielles pour le phénomène de tolérance et la suppression de l'immunité anti-tumorale. Effectivement, les lymphocytes T régulateurs inhibent l'activation, la prolifération et les fonctions effectrices des LT CD4⁺, LT CD8⁺, lymphocytes B, cellules NKT, NK, monocytes et macrophages (**Figure 3**). Cette immuno-suppression est permise par plusieurs mécanismes ¹²⁷ : la sécrétion ou l'induction de l'expression de cytokines immuno-suppressives (TGF- β , IL-10, IL-35), l'utilisation des points de contrôle du système immunitaire et des récepteurs inhibiteurs [CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte (CTL)-associated antigen 4*), PD-1 (*Programmed cell Death-1*), LAG-3 (*Lymphocyte activation gene 3*), TIM-3 (*T-cell immunoglobulin and mucin protein 3*), ICOS (*Inducible Costimulator*), TIGIT (*T cell ITIM domain*)], ainsi que la modulation du métabolisme du tryptophane suite à l'expression de l'IDO. Ils sont également capables de provoquer la lyse cytotoxique des lymphocytes T effecteurs médiée par la voie perforine/granzyme, d'engendrer une consommation compétitive d'IL-2 au niveau du micro-environnement tumoral, et de favoriser la tolérance des cellules dendritiques envers les cellules malignes ^{126,127}.

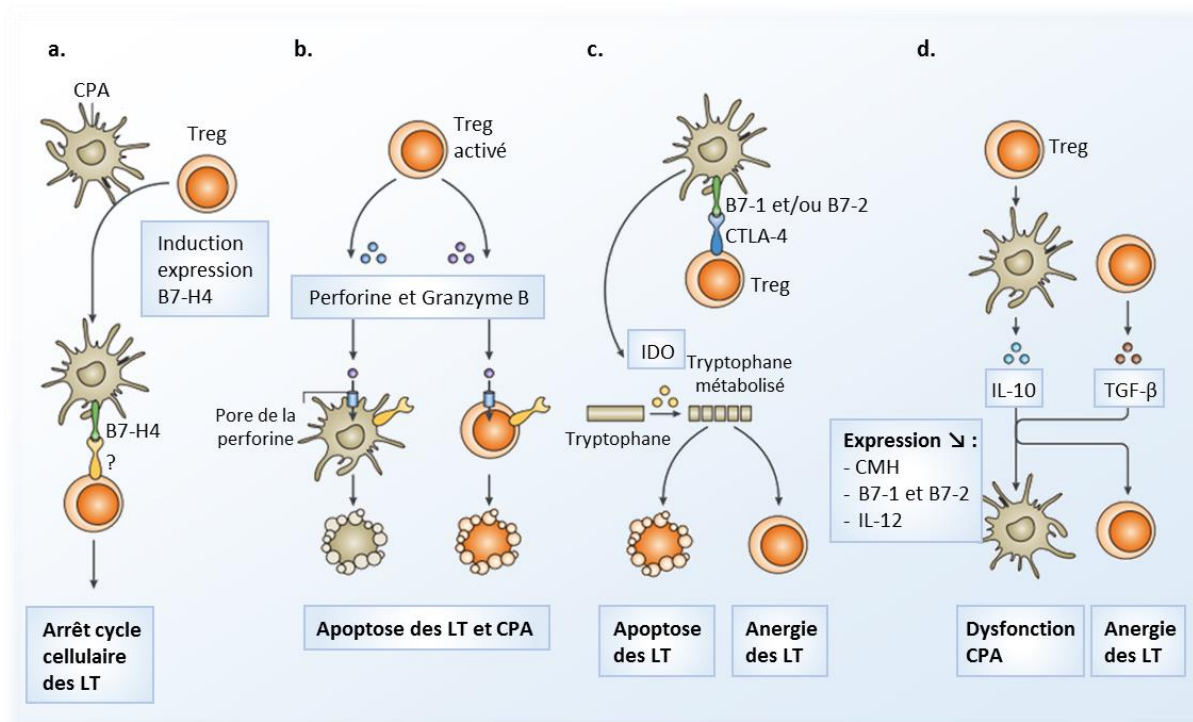


Figure 3 : Mécanismes immuno-suppresseurs des lymphocytes T régulateurs.

Quatre mécanismes suppressifs sont proposés. (a) Les cellules Treg induisent l'expression de B7-H4 à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA), ensuite responsable de l'arrêt du cycle cellulaire des lymphocytes T. (b) Les cellules Treg activées détruisent directement les cellules cibles telles que les cellules T et les CPA par l'intermédiaire de voies dépendantes de la perforine ou de la granzyme B. (c) L'activation des Tregs CTLA-4⁺ (Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) après interaction avec les ligands B7-1 ou B7-2 engendre l'expression de l'enzyme IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase) par les CPA, provoquant à son tour l'apoptose et l'anergie des cellules T après réduction du tryptophane dans le milieu. (d) La libération d'IL-10 (Interleukine-10) et de TGF-β (Transforming growth factor β) par les Treg inhibe directement l'activation et fonctions des cellules T et des CPA, en supprimant l'expression des molécules du CMH, de B7-1, de B7-2 et de l'IL-12. Adapté de ¹²⁶.

3.1.2.3. Les lymphocytes Th17

Les LT CD4⁺ Th17, dont la différenciation est favorisée par l'IL-6 et le TGF-β sécrétés par les tumeurs, sont retrouvés parmi les TILs et sont facteurs de mauvais pronostic ¹²⁹. En effet, ils favorisent le trafic et la rétention des cellules T effectrices et des NK dans l'environnement tumoral, en induisant la production des chimiokines CXCL9 et CXCL10 (CXC-chimiokine ligand 9/10) par les cellules tumorales primaires. De la même manière, le recrutement de cellules dendritiques CCR6⁺ (C-C Motif Chemokine Receptor 6) se fait suite à la production de CCL20 (C-C Motif Chemokine Ligand 20) par les cellules cancéreuses. Par conséquent, les cellules Th17 génèrent une immunité anti-tumorale protectrice en recrutant des cellules effectrices pro-inflammatoires ¹²⁹. D'autre part, l'interleukine-17 a un effet pro-angiogénique en permettant l'expression du VEGF ¹²⁹. Toutefois, une étude publiée

en 2008 a mis en évidence un rôle anti-tumoral des cellules Th17 en provoquant le rejet de tumeurs *in vivo*, de manière dépendante à l'IFN- γ ¹³⁰.

3.1.2.4. Les macrophages associés aux tumeurs (TAM)

La moelle osseuse produit des monocytes qui circulent et migrent dans les tissus périphériques sous l'influence de chimiokines, puis se différencient en macrophages résidents de type M1 ou M2 selon les stimuli extérieurs. Les macrophages M1, induits par l'IFN- γ ou des protéines microbiennes (LPS, Lipopolysaccharide), ont un rôle dans la réponse anti-microbienne et la mise en place de la réponse immune adaptative ¹³¹. A l'inverse, le phénotype M2 généré par l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13 et les glucocorticoïdes, possède une fonction anti-inflammatoire en sécrétant de l'IL-10 et du TGF- β ¹³². Les tumeurs recrutent des macrophages, majoritairement de type M2 et au niveau du stroma tumoral, après sécrétion de divers facteurs tels que MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1* ou CCL2), CSF-1 (*Colony Stimulating Factor 1* ou M-CSF) et VEGF ¹³³. L'accumulation de ces macrophages, appelés TAM (macrophages associés aux tumeurs), est facteur de mauvais pronostic ^{133,134}. Leur effet immuno-suppresseur est dû en partie à la production de cytokines anti-inflammatoires (TGF- β , IL-10 et PGE2) générant une réponse immune Th2 et d'autres mécanismes d'immuno-évasion dont nous avons discuté précédemment ¹³¹. En outre, les TAM expriment un ensemble de molécules effectrices inhibitrices des réponses immunes anti-tumorales, incluant des récepteurs cellulaires de surface, des cytokines, des chimiokines et des enzymes ¹³⁵. Par exemple, les TAM expriment les ligands des récepteurs PD-1 et CTLA-4 qui, après activation, suppriment les fonctions cytotoxiques des cellules T, NKT et NK. Ils expriment également le ligand des récepteurs de mort Fas et TRAIL, déclenchant l'apoptose des cellules cibles ¹³⁵. Enfin, les macrophages associés aux tumeurs ont la capacité d'agir directement au niveau des cellules tumorales : leur sécrétion d'IL-1 β , interleukine activatrice de la voie Wnt, protège les cellules malignes de l'apoptose induite par TRAIL ¹³⁶. De plus, leur expression des facteurs de croissance FGF (*fibroblast growth factor*), HGF (*hepatocyte growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*) et PDGF (*Platelet-derived growth factor*) favorise la prolifération et la mobilité des cellules cancéreuses ainsi que l'angiogénèse tumorale ¹³⁴.

3.1.2.5. Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC)

Les cellules MDSC (*myeloid-derived suppressor cells*) sont les précurseurs des cellules dendritiques, macrophages, granulocytes et cellules myéloïdes, bloqués à un stade immature de différenciation. Lors du développement tumoral, leur accumulation permise par des facteurs solubles et micro-vésicules tumorales est corrélée au grade tumoral ^{133,137}. La présence de MDSCs est également associée à une diminution de l'immunité anti-tumorale,

notamment des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ en inhibant la production d'IFN- γ ¹³⁷. Ces cellules peuvent sécréter des cytokines immuno-suppressives, des espèces réactives d'oxygène (ROS) ainsi que de l'oxyde nitrique (NO) ¹³⁸.

3.1.2.6. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)

Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs), aussi appelées cellules progénitrices multipotentes ou CFU-F (*Colony Forming Units-Fibroblast*), sont des cellules multipotentes à l'origine des cellules mésodermiques, endodermiques et ectodermiques ¹³⁹. Elles sont donc essentielles au maintien de l'homéostasie tissulaire. Dans le cas de pathologies cancéreuses, ces cellules sont recrutées au niveau du site tumoral pour exercer leurs propriétés immuno-suppressives envers les LT CD4⁺, CD8⁺, LB, DCs et NK ¹⁴⁰. Les effets immuno-régulateurs des CSMs sont induits par des facteurs solubles tels que le TGF- β 1, l'HGF, l'IL-10, la PGE2, l'IDO, HMOX1 (Hème Oxygénase-1), l'iNOS (*inducible nitric-oxide synthase*), ainsi que par la libération de sHLA-G5 ¹⁴⁰.

3.1.2.7. Les fibroblastes associés au cancer (CAFs)

Les fibroblastes sont les principaux composants des tissus conjonctifs et participent activement à l'homéostasie tissulaire en produisant divers constituants de la matrice extracellulaire. Les fibroblastes associés au cancer (CAFs) infiltrant le stroma tumoral et possèdent un rôle majeur dans le développement des tumeurs, en contribuant à la croissance tumorale, l'invasion et la migration, l'angiogénèse, à la dérégulation du métabolisme énergétique, mais aussi à l'immuno-évasion tumorale, en promouvant notamment un état inflammatoire ¹⁴¹.

Lors des premiers stades néoplasiques, les CAFs recrutent des cellules T au niveau du stroma tumoral en sécrétant des chimiokines et favorisent l'inflammation chronique suite à une inhibition sévère des réponses T anti-tumorales spécifiques. Cette suppression d'activité est la conséquence de la sécrétion par les CAFs de facteurs paracrines, par exemple la TSLP (Phosphatidylsérine stromale thymique), qui modulent le micro-environnement et permettent l'obtention d'un profil CD4⁺ Th2 pro-tumoral ^{138,142}. La présence de cytokines Th2, comme l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13, renforce l'état immuno-suppresseur et pro-tumorigène du micro-environnement, en permettant le recrutement de cellules MDSCs et Tregs ¹³⁸. En outre, la sécrétion de facteurs TGF- β , IDO et PGE2 par les CAFs, ainsi que l'augmentation de l'expression des ligands du récepteur co-inhibiteur lymphocytaire PD-1 à leur surface, suppriment considérablement l'activité des CTLs et d'autres cellules immunes telles que les NK ¹³⁸.

Les CAFs sont donc les architectes du milieu inflammatoire cancéreux et subvertissent les réponses anti-tumorales des lymphocytes T afin de faciliter la croissance tumorale et la métastase.

En conclusion, la dérégulation de la machinerie cellulaire du système immunitaire par les tumeurs utilise de nombreux mécanismes, formant un réseau complexe d'évènements et impliquant de multiples effecteurs cellulaires et protéiques. De manière intéressante, les cellules malignes peuvent également échapper au système immunitaire anti-tumoral en exploitant les points de contrôle immunitaires inhibiteurs, ou *immune checkpoints inhibitors*.

3.2. Les *immune checkpoint inhibitors*

3.2.1. Quelques généralités

Les cellules T sont initialement stimulées par le TCR suite à la reconnaissance d'antigènes présentés par des molécules du CMH. L'activation optimale des lymphocytes nécessite un second signal co-stimulateur, fournissant des informations contextuelles et garantissant une réponse appropriée (activation ou inhibition de la réponse lymphocytaire)¹⁴³. Ces signaux de co-stimulation sont des régulateurs clés de l'activation des cellules T, de leur tolérance et leur épuisement. La modulation thérapeutique de ces voies co-stimulatrices se traduit par de nouvelles stratégies efficaces pour traiter le cancer¹⁴⁴, les maladies auto-immunes¹⁴⁵ et infectieuses¹⁴³ ainsi que le rejet des transplantations^{119,146}.

Plusieurs décennies de travail ont révélé une énorme diversité non seulement des voies co-stimulatrices positives qui induisent l'activation des lymphocytes, mais aussi des récepteurs co-stimulateurs négatifs ou inhibiteurs qui contre-balancent ces signaux d'activation¹⁴⁴.

Ces molécules co-stimulatrices négatives, autrement appelées *immune checkpoint inhibitors*, appartiennent en grande majorité à la superfamille des immunoglobulines et notamment à la famille B7/CD28. Les récepteurs inhibiteurs les plus étudiés et décrits sont *Cytotoxic T lymphocyte (CTL)-associated antigen 4* (CTLA-4, CD152) et *programmed cell death protein 1* (PD-1, CD279) ; ils régulent les réponses immunes à différents niveaux et par différents mécanismes¹⁴⁷. De multiples autres molécules co-inhibitrices ont été décrites ces dernières années, telles que *B- and T-lymphocyte attenuator* (BTLA), *V-domain Ig suppressor of T-cell activation* (VISTA), *TIM-3*, *T Cell ITIM Domain* (TIGIT), *Lymphocyte activation gene 3* (LAG-3), ainsi que la famille des butyrophilines^{119,148,149}.

L'engouement actuel que génèrent ces molécules provient en grande partie du succès clinique des anticorps bloquants ciblant CTLA-4 et PD-1, deux récepteurs inhibiteurs exprimés par les lymphocytes. Ces anticorps, comprenant l'Ipilimumab (Yervoy®), le

Pembrolizumab (Keytruda®) et le Nivolumab (Opdivo®), perturbent les signaux régulateurs négatifs engendrés par ces récepteurs et conduisent à une régression clinique remarquable du mélanome et d'autres cancers ¹⁴⁴. Le **Tableau 4** ci-dessous résume les caractéristiques, les profils d'expression et les fonctions des principales protéines co-inhibitrices. Le récepteur PD-1 ainsi que ses ligands seront étudiés plus en détail par la suite.

	EXPRESSION ET CARACTÉRISTIQUES	FONCTIONS					
MEMBRES DE LA FAMILLE B7							
Structure protéique commune							
<ul style="list-style-type: none"> - Domaine IgV (Immunoglobuline domaine variable) extracellulaire séparé du domaine trans-membranaire par une « tige » (qui permet l'homodimérisation au niveau d'un résidu cystéine) - Domaine cytoplasmique contenant au moins un motif tyrosine - Possèdent un site de liaison des ligands (motif PPP, complémentaire aux ligands B7) ¹¹⁹ 							
CTLA-4	<p>Expression ¹¹⁹</p> <ul style="list-style-type: none"> - LB, Tregs, DCs, monocytes, granulocytes - Surface des LT après stimulation TCR - Cellules murines embryonnaires glande pituitaire, fibroblastes placental, corps embryoides des cellules souches CD34⁺ - Cellules progénitrices, stromales <p>Caractéristiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - Récepteur homodimère inhibiteur - Homologie de structure avec CD28 - Ligands CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) ; affinité plus forte que CD28 ¹¹⁹ 	<p style="text-align: center;"><u>Inhibition réponse T :</u></p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 33%; vertical-align: top;"> <p>↘ signalisation initiée par TCR</p> <p>--</p> <p>car entre en compétition avec CD28 (récepteur co-stimulateur) pour se lier à CD80 et CD86 ¹¹⁹</p> </td> <td style="width: 33%; vertical-align: top; border-left: 1px dashed black;"> <p>↘ CD80 et CD86 à la surface CPAs</p> <p>--</p> <p>donc ↘ activation LT par ces protéines ¹¹⁹</p> </td> <td style="width: 33%; vertical-align: top;"> <p>↘ prolifération et activité des LT ^{119,150}</p> <p>↘</p> <p>différenciation LT CD4⁺ en Th2 et Th17 ¹⁵⁰</p> </td> </tr> </table> <p style="text-align: center;"><u>Régulation activités Tregs, LB, NK et DCs :</u></p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>↗ activité des Tregs car déplétion CTLA-4 à la surface des Tregs ↗</p> <p>↗ sécrétion anticorps par LB ¹⁵⁰</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p style="text-align: center;"><i>Module la différenciation et la production de cytokines par les monocytes et les NK</i></p> <p style="text-align: right;">¹¹⁹</p> </td> </tr> </table>	<p>↘ signalisation initiée par TCR</p> <p>--</p> <p>car entre en compétition avec CD28 (récepteur co-stimulateur) pour se lier à CD80 et CD86 ¹¹⁹</p>	<p>↘ CD80 et CD86 à la surface CPAs</p> <p>--</p> <p>donc ↘ activation LT par ces protéines ¹¹⁹</p>	<p>↘ prolifération et activité des LT ^{119,150}</p> <p>↘</p> <p>différenciation LT CD4⁺ en Th2 et Th17 ¹⁵⁰</p>	<p>↗ activité des Tregs car déplétion CTLA-4 à la surface des Tregs ↗</p> <p>↗ sécrétion anticorps par LB ¹⁵⁰</p>	<p style="text-align: center;"><i>Module la différenciation et la production de cytokines par les monocytes et les NK</i></p> <p style="text-align: right;">¹¹⁹</p>
<p>↘ signalisation initiée par TCR</p> <p>--</p> <p>car entre en compétition avec CD28 (récepteur co-stimulateur) pour se lier à CD80 et CD86 ¹¹⁹</p>	<p>↘ CD80 et CD86 à la surface CPAs</p> <p>--</p> <p>donc ↘ activation LT par ces protéines ¹¹⁹</p>	<p>↘ prolifération et activité des LT ^{119,150}</p> <p>↘</p> <p>différenciation LT CD4⁺ en Th2 et Th17 ¹⁵⁰</p>					
<p>↗ activité des Tregs car déplétion CTLA-4 à la surface des Tregs ↗</p> <p>↗ sécrétion anticorps par LB ¹⁵⁰</p>	<p style="text-align: center;"><i>Module la différenciation et la production de cytokines par les monocytes et les NK</i></p> <p style="text-align: right;">¹¹⁹</p>						
VISTA (B7-H5 OU PD-1H)	<p>Expression ^{147,151}</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tissus normaux : majoritairement sur les cellules myéloïdes CD11b⁺ (monocytes, macrophages, CD8 et neutrophiles) et faiblement sur LT CD4⁺, CD8⁺, Tregs - Tumeurs : expression élevée sur les TILs, MDSC et Tregs. <p>Caractéristiques ^{147,151}</p> <ul style="list-style-type: none"> - Homologie de structure avec PD-L1 et PD-1 - Agit comme ligand (interaction avec un récepteur lymphocytaire inconnu) - Rôle de récepteur inhibiteur 	<p style="text-align: center;"><u>Régulation négative réponse T :</u> ^{147,151}</p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p style="text-align: center;">Ligand</p> <p>Protéine soluble VISTA-Ig</p> <p>↘ prolifération et production de cytokines par les LT CD4⁺</p> <p>↗ induction de Tregs</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p style="text-align: center;">Récepteur</p> <p>LT VISTA-déficients : prolifération et production de cytokines augmentées <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>, après activation par des antigènes tumoraux</p> </td> </tr> </table> <p style="text-align: center;"><u>Immuno-échappement tumoral :</u> ¹⁴⁷</p> <ul style="list-style-type: none"> - Souris VISTA-déficientes : réponse immune anti-tumorale ↗ - Blocage de VISTA : <ul style="list-style-type: none"> ▪ ↘ nombre de MDSC, ▪ Activation DCs ▪ ↗ prolifération et fonctions effectrices des LT CD4⁺ et CD8⁺ 	<p style="text-align: center;">Ligand</p> <p>Protéine soluble VISTA-Ig</p> <p>↘ prolifération et production de cytokines par les LT CD4⁺</p> <p>↗ induction de Tregs</p>	<p style="text-align: center;">Récepteur</p> <p>LT VISTA-déficients : prolifération et production de cytokines augmentées <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>, après activation par des antigènes tumoraux</p>			
<p style="text-align: center;">Ligand</p> <p>Protéine soluble VISTA-Ig</p> <p>↘ prolifération et production de cytokines par les LT CD4⁺</p> <p>↗ induction de Tregs</p>	<p style="text-align: center;">Récepteur</p> <p>LT VISTA-déficients : prolifération et production de cytokines augmentées <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>, après activation par des antigènes tumoraux</p>						

TIGIT	<p>Expression ^{151,152}</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cellules T activées, T mémoires, Tregs et NK - Grand nombre de tumeurs 	<p>Tolérance immune : ^{151,152}</p> <p>Interaction avec CD226 empêche son homodimérisation et activation.</p>	<p>Module la balance des cytokines : ↘ IFN-γ et IL-17 ↗ IL-10</p>	<p>Interaction avec CD155 sur les DCs : ↘ IL-12 ↗ IL-10</p>
	<p>Caractéristiques ^{151,152}</p> <ul style="list-style-type: none"> - Homologie avec récepteurs : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Co-activateur CD226 ▪ Co-inhibiteur CD96 - Ligands : CD112 et CD155 <ul style="list-style-type: none"> ▪ Exprimés sur CPAs, LT, cellules non hématopoïétiques et tumorales ▪ Affinité plus forte avec TIGIT 	<p>Régulation négative réponse T : ^{151,152}</p> <p>↗ phénotype suppressif des Tregs dans les tissus tumoraux</p>	<p>↗ phénotypes CD4⁺ Th1 et Th17 ↗ Th2</p>	<p>TILs murins CD8⁺ TIGIT⁺ dysfonctionnels co-expriment PD-1, LAG-3 et TIM-3. Effets co-inhibiteurs synergiques.</p>
BTLA	<p>Expression ¹⁴⁷</p> <ul style="list-style-type: none"> - LB, DCs matures, macrophages, LT naïfs ou anergiques 	<p>Rôle de récepteur co-inhibiteur : ¹⁴⁷</p> <p>Souris <i>BTLA</i>-déficientes : ↗ niveaux d'anticorps anti-protéines du soi, ↗ activation LT CD4⁺ périphériques et infiltration de cellules inflammatoires dans de multiples organes.</p> <ul style="list-style-type: none"> - ↘ prolifération et activation (production cytokines) des LT - Patients atteints de mélanome : co-expression BTLA et PD-1 sur LT CD8⁺ dysfonctionnels - Effets synergiques avec PD-1 et TIM-3. 		
	<p>Caractéristiques ¹⁴⁷</p> <ul style="list-style-type: none"> - Homologie de structure avec CTLA-4 et PD-1. - Ligand de HVEM (<i>Virus Entry Mediator</i>), membre de la famille TNFR (<i>Tumor necrosis factor receptor</i>) et exprimé sur LB, LT, NK, DCs et cellules myéloïdes. - Récepteur co-inhibiteur 	<p>Rôle de ligand co-activateur : ¹⁴⁷</p> <ul style="list-style-type: none"> - ↗ survie et prolifération des cellules T HVEM⁺ (effectrices et mémoires) dans les modèles murins - ↗ prolifération et survie TILs BTLA⁺ après stimulation par IL-2 		

AUTRES FAMILLES / PROTÉINES

TIM-3	<p>Expression ^{151,152}</p> <ul style="list-style-type: none"> - Surface des LT activés, NK, monocytes et DCs 	<ul style="list-style-type: none"> - Tissus normaux : marqueur de cellules NK actives ^{151,152} - Pathologies malignes : NK TIM-3⁺ dysfonctionnels
	<p>Caractéristiques ^{151,152}</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ligands : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Galectine-9 ▪ HMGB1 (<i>High Mobility Group Protein B1</i>) ▪ CECAM1 (<i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> - Majorité Tregs présents dans tissu tumoral sont TIM-3⁺ ^{151,152} - ↗ fonctions immuno-suppressives Tregs (↗ granzymes, perforine, FOXP3 et IL-10) ^{151,152} - Expression sur Tregs et NK corrélée à mauvais pronostic avec présence de métastases et stade avancé ^{151,152}. - Interaction avec HMGB1 inhibe l'activation des DCs ^{151,152} - ↘ production IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12 et TNF-α par les monocytes et les macrophages ^{151,152} - Co-expression TIM-3 et PD-1 sur TILs : phénotype d'épuisement, avec ↘ capacités prolifératives et de sécrétion de cytokines (IFN-γ, IL-2 et TNF-α) ^{151,152}. - Effets synergiques.

LAG-3	<p>Expression ^{151,152}</p> <ul style="list-style-type: none"> - LB, LT activés CD4⁺ et CD8⁺, Tregs, NK et DCs <p>Caractéristiques ^{151,152}</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ligands : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Molécules CMH-II ▪ LSECtin (<i>Liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> - Régule l'homéostasie des cellules T en activant les Tregs ^{151,152} - Souvent co-exprimé avec PD-1 à la surface des TILs CD4⁺ et CD8⁺ dysfonctionnels ou épuisés <i>Ex : patients atteints de mélanome ou cancer ovarien</i> ^{151,152} - Effets synergiques entre LAG-3 et PD-1 ^{151,152}
BUTYROPHILINES	<p>Expression ^{119,153}</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cellules immunes, stromales thymiques et épithéliales. - BTNL2 (<i>Butyrophilin Like 2</i>) exprimée à la surface des LT, LB et macrophages. <p>Caractéristiques ^{119,153}</p> <ul style="list-style-type: none"> - Homologie de structure avec les domaines IgV et IgC des membres B7 (CTLA-4 et PD-1) - Récepteur de BTNL2 inconnu ; CD28, CTLA-4, ICOS et PD-1 exclus 	<p><u>Inhibition de l'activité des LT</u> : ^{119,153}</p> <p>↘ prolifération, activité et production de cytokines par les LT (IL-2, TNF-α, GM-CSF, IL-10, IL-4, IL-6, IL-17 et IFN-γ)</p> <p>BTNL2 et BTN2A2 permettent la différenciation des LT CD4⁺ naïfs en Tregs</p> <p><u>Effet co-stimulateur</u> :</p> <p>BTNL8-Fc renforce la co-stimulation de cellules T dormantes, favorise leur prolifération et la production de cytokines Th1 (IFN-γ et TNF-α) et Th2 (IL-10)</p>

Tableau 4: Caractéristiques, patterns d'expression et fonctions des principales protéines co-inhibitrices. Protéines appartenant à la famille B7 comme CTLA-4, VISTA, TIGIT, BTLA, ainsi que d'autres molécules telles que TIM-3, LAG-3 et la famille des Butyrophilines.

En conclusion, malgré l'individualité de chacun de ces *immune checkpoint inhibitors*, tous sont communément co-exprimés à la surface des cellules T spécifiques suite à une exposition prolongée à des antigènes cancéreux. Ainsi, des blocages combinés d'*immune checkpoint inhibitors* par des anticorps monoclonaux sont de ce fait plus efficaces qu'un mono-blocage dans l'activation de la réponse immunitaire ¹⁵⁴.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée particulièrement à la protéine PD-L1, ligand du récepteur PD-1, dont les caractéristiques et fonctions sont détaillées ci-dessous.

3.2.2. Cas du récepteur PD-1 (Programmed cell death-1)

3.2.2.1. Structure et expression de la protéine PD-1

L'ADNc de la protéine *Programmed cell death-1* (PD-1) a été isolé en 1992 à partir de lignées murines de lymphocytes T et de cellules progénitrices hématopoïétiques apoptotiques ¹¹⁹. PD-1 est une protéine transmembranaire composée de 288 acides aminés. Son domaine cytoplasmique possède deux tyrosines, l'une constituant le domaine ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitor Motif*) et l'autre le domaine ITSM (*Immunoreceptor Tyrosine Switch Motif*), indispensable à son rôle immuno-suppresseur ¹¹⁹.

Contrairement à CD28 et CTLA-4, PD-1 est un récepteur monomérique, dû à la perte dans la portion proximale membranaire du résidu cystéine responsable de la dimérisation ¹⁵⁵.

PD-1 est exprimée de façon inductible à la surface des LT CD4⁺, LT CD8⁺, LB, NK, NKT, macrophages et cellules dendritiques lors du développement thymique ¹¹⁹. Elle est codée par le gène *PDCD1* (*Programmed cell Death-1*) localisé sur le chromosome 1 chez la souris et le chromosome 2 chez l'Homme. Ce gène possède 5 exons : l'exon 1 code une courte séquence signal, l'exon 2 code le domaine IgV, l'exon 3 le domaine transmembranaire tandis que les exons 4 et 5 codent le domaine cytoplasmique contenant les motifs ITIM et ITSM ^{119,155}. Quatre variants d'épissage sont exprimés chez l'Homme, dont une forme soluble suite à la perte de l'exon 3 et donc du domaine transmembranaire. Ce variant est impliqué dans des pathologies inflammatoires et auto-immunes ¹¹⁹. Un faible niveau d'expression protéique de PD-1 est suffisant pour assurer l'inhibition des fonctions lymphocytaires T ¹⁵⁴.

3.2.2.2. Ligands du récepteur PD-1

Ce récepteur co-inhibiteur possède deux ligands, *Programmed death-ligand 1* [PD-L1, autrement nommé B7-H1 (*B7 Homolog 1*) ou CD274] et *Programmed death-ligand 2* [PD-L2, appelé B7-DC (*B7 Dendritic Cell Molecule*) ou CD273]. L'affinité de PD-L2 pour PD-1 est environ 3 fois plus élevée que PD-L1 ¹¹⁹.

La protéine PD-L2 est exprimée sélectivement par les CPAs mais aussi par les cellules tumorales. Son interaction avec PD-1 induit la suppression des fonctions des cellules T ¹⁵⁴. L'expression de PD-L1 en conditions inflammatoires est retrouvée à la surface de cellules épithéliales, lymphoïdes, myéloïdes, mais aussi des cellules présentatrices des antigènes et cellules tumorales ¹⁵⁴. Il a été démontré que des souris déficientes en PD-L1 sont sujettes à davantage de maladies auto-immunes, bien que cette souche de souris ne développe pas ce genre de pathologies de manière spontanée ¹¹⁹. Il est apparu plus tard que l'interaction PD-1/PD-L1 joue un rôle prédominant dans la suppression des réponses lymphocytaires T *in vitro* et *in vivo* ^{119,120,156}, favorisant ainsi le développement tumoral ¹⁵⁷.

De manière intéressante, des études de mutagenèse ont révélé que les protéines PD-L1 et PD-L2 peuvent également interagir avec d'autres molécules que PD-1, donnant lieu à des fonctions distinctes. Par exemple, PD-L1 interagit avec CD80 (B7-1) sur les cellules T et engendre un signal inhibiteur ¹⁵⁸. Cette découverte est surprenante car CD80 a déjà été identifié comme ligand fonctionnel de CD28 et CTLA-4 ¹¹⁹. D'autre part, PD-L2 peut se lier avec la RGMb (molécule de guidage répulsif membre de la famille), sur-exprimée dans les macrophages pulmonaires et nécessaire à l'induction de la tolérance respiratoire ¹⁵⁵.

3.2.2.3. Fonctions immuno-suppressives de PD-1

Malgré des premières données *in vitro* suggérant un rôle co-stimulateur possible de PD-L1 dans la prolifération des LT et l'induction d'une réponse Th2, de nombreuses autres études utilisant des anticorps bloquant et des souris KO (*knock-out*) ont depuis démontré l'effet immuno-suppresseur de son interaction avec PD-1¹⁵⁵. En effet, une déplétion en PD-1 dans divers modèles murins donne lieu à des phénotypes d'auto-immunité, suggérant un rôle régulateur négatif de ce récepteur envers les lymphocytes T¹¹⁹. La signalisation orchestrée par PD-1 altère les réponses T de plusieurs manières agissant de concert ; par exemple, l'engagement de PD-1 par PD-L1 provoque l'apoptose des LT activés et stimule la production d'IL-10 par les cellules T périphériques afin de médier l'immuno-suppression^{155,159}. Toutefois, cet effet co-inhibiteur est en réalité bien plus complexe. L'axe PD-1/PD-L1 peut en effet générer un dysfonctionnement des lymphocytes T en favorisant leur anergie et épuisement *in vitro* et *in vivo*, mais aussi impacter leurs capacités prolifératives et de motilité, ainsi que provoquer une diminution de leur production en molécules effectrices cytotoxiques, mettant à mal leur aptitude à détruire les cellules anormales¹⁵⁵. L'administration d'anticorps bloquant monoclonal (mAb) anti-PD-L1 restaure l'activité anti-tumorale de ces lymphocytes¹⁵⁵. De plus, des études récentes suggèrent une reprogrammation métabolique des lymphocytes T suite à l'engagement de PD-1 par PD-L1 ; l'activation de cet axe diminuerait le métabolisme de glycolyse aérobie, nécessaire à leurs fonctions effectrices et à leur différenciation en phénotypes Th1 et Th17¹¹⁹, au profit d'un programme promouvant la génération de Tregs et la β -oxydation¹⁶⁰. La promotion des Tregs et le maintien de leurs fonctions immuno-suppressives par PD-1/PD-L1 sont également dus à une diminution de l'activité des protéines phospho-AKT (AKT Sérine/Thréonine Kinase), mTOR (*Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase*), S6 et ERK2 (*Extracellular Signal-Regulated Kinase 2*) et à une surexpression de PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*), molécules clés dans le développement des Tregs^{161,162}.

Bien que l'activation des lymphocytes T suite au blocage de l'axe PD-1/PD-L1 soit bien établie, le rôle que peut jouer cette voie au niveau des TAMs est peu décrit. Une étude a montré que l'expression de PD-1 par les TAMs est corrélée négativement à leurs capacités phagocytaires contre les cellules tumorales ; le récepteur PD-1 serait en effet exprimé plus fortement à la surface des macrophages de type M2 que des M1. A l'inverse, le blocage de cet axe *in vivo* augmente la phagocytose par les macrophages, réduit la croissance tumorale et allonge la survie des souris¹⁶³. Par ailleurs, l'expression de PD-1 est retrouvée à la surface des cellules NK issues de patients atteints de myélome multiple, contrairement aux cellules NK normales. L'engagement de ce récepteur suite à son interaction avec PD-L1 exprimée sur les cellules de myélome diminue l'activité effectrice anti-tumorale des NK¹⁶⁴. Enfin, l'axe PD-1/PD-L1 génère une résistance intrinsèque des cellules cancéreuses à la

destruction par les LT, en empêchant leur mort par apoptose. On parle de « bouclier moléculaire »¹⁶⁵.

3.2.2.4. Mécanismes moléculaires impliqués dans ces fonctions immuno-suppressives

Si le rôle immuno-suppresseur de PD-1 est bien connu, des études complémentaires seraient nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes permettant à son domaine intracellulaire de moduler la réponse lymphocytaire¹¹⁹.

L'interaction de PD-1 avec PD-L1 ou PD-L2 induit la phosphorylation de ses motifs ITIM (Y223) et ITSM (Y248), provoquant le recrutement des phosphatases SHP-2 (*Src homology 2-containing phosphotyrosine phosphatase*) et SHP-1. Cela engendre une diminution des signaux co-activateurs en aval du TCR [ou du BCR (*B-cell receptor*)], par déphosphorylation des intermédiaires de signalisation [CD3z, ZAP70 (*70 KDa Zeta-Associated Protein*) et PKC θ (Protéine kinase C θ) dans les cellules T ; SYK et PI3K (phosphatidyl inositol-3-phosphate kinase) dans les cellules B]¹¹⁹. Il en résulte une diminution de l'activation des lymphocytes T et de leur production en cytokines. Toutefois, des données récentes suggèrent que PD-1 agit essentiellement en inhibant les effets du récepteur co-activateur CD28 : ce dernier serait la cible privilégiée de la phosphatase SHP-2, recrutée par PD-1¹⁶⁶. La voie CD28/B7 est par ailleurs essentielle pour qu'une thérapie ciblant PD-1 soit efficace dans des modèles murins de cancers : la réactivation des cellules LT CD8⁺ après le blocage de PD-1 nécessiterait l'expression de CD28¹⁶⁷. D'autre part, les voies PI3K/AKT et RAS/MEK (*Mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase*)/ERK impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire sont inhibées suite à l'engagement de PD-1 par PD-L1¹¹⁹.

Ainsi, les cellules tumorales exploitent l'axe PD-1/PD-L1 afin d'empêcher leur éradication par les cellules de l'immunité. Un grand nombre d'antagonistes de cette voie visant à inverser le dysfonctionnement des lymphocytes T sont actuellement en cours d'essais cliniques ; les résultats sont probants, puisque des taux de réponse globale allant de 10% à 87% (avec une moyenne d'environ 20%) sont observés pour de multiples cancers. Cela a d'ailleurs abouti à l'approbation par la FDA (*Food and Drug Administration*) de médicaments mAb anti-PD-1 dans le cas du mélanome avancé, du cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) et du cancer rénal¹¹⁹.

4. La famille B7, protéines d'immuno-régulation

Comme nous venons de le voir, la régulation du système immunitaire est permise par des signaux activateurs et inhibiteurs, faisant intervenir de nombreuses molécules de co-stimulation¹⁴⁸. Une prédominance de signaux positifs active les lymphocytes T et se traduit par la sécrétion de cytokines et de granules cytolytiques détruisant spécifiquement les cellules cibles sans endommager les cellules environnantes. A l'inverse, une majorité de signaux négatifs inhibe ces lymphocytes et peut provoquer leur mort par apoptose. L'expression des molécules de co-stimulation par les CPAs est modulée en réponse à des modifications physiologiques mais aussi pathologiques¹⁴⁸. En effet, la surexpression de ces protéines à la surface des cellules tumorales ou infectées par des virus ou bactéries peut conduire à l'inhibition de la réponse lymphocytaire et à leur échappement au système immunitaire. Ces molécules appartiennent le plus souvent à la famille de protéines B7.

4.1. Généralités et structure des protéines B7

Les molécules B7 sont des protéines de surface, considérées comme ligands de récepteurs lymphocytaires, membres de la famille CD28^{168,169,170}. Elles sont exprimées à la surface des CPAs, des cellules de l'immunité, des cellules du micro-environnement tumoral ainsi que sur les cellules malignes de tumeurs solides et des hémopathies malignes¹⁵⁷. Leur expression à la surface de ces dernières est dans la majorité des cas un facteur de mauvais pronostic¹⁷¹.

Ce large profil d'expression leur confère un rôle immunologique essentiel ; en effet, les molécules co-activatrices activent ou amplifient la réponse immune effectrice, alors que les membres co-inhibiteurs diminuent ou empêchent l'activation des cellules immunitaires et leur différenciation¹⁴⁸. Cette dualité d'action dépend du récepteur lymphocytaire avec lequel la protéine B7 interagit. Par exemple, les protéines B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) stimulent les lymphocytes T suite à leur interaction avec le récepteur activateur CD28. A l'inverse, elles inhibent les fonctions de ces LT et induisent une tolérance immune en se liant à CTLA-4¹⁴⁸.

Ces protéines B7 sont transmembranaires. Leur partie extra-membranaire est composée d'un domaine immunoglobuline constant (IgC) et d'un domaine variable (IgV) ; chacune de ces deux régions est codée par un seul exon. Il est intéressant de noter que les domaines immunoglobulines sont essentiels aux interactions inter-protéines, telles que les protéines du système immunitaire exprimées en surface. Par exemple, le domaine N-terminal IgV de B7-1 ou de B7-2 correspond au domaine d'interaction avec leur récepteur

lymphocytaire ¹⁶⁸. Concernant la courte partie cytoplasmique de ces protéines B7 (de 19 à 62aa), celle-ci peut être codée par de multiples exons et possède des résidus sérine thréonine potentiellement phosphorylables ¹⁶⁸.

A ce jour, plus de dix molécules B7 ont été mises en évidence ¹⁷². Les deux premières décrites sont B7-1 et B7-2, qui interagissent avec les récepteurs CD28 et CTLA-4 selon le contexte cellulaire et interviennent comme second signal après la reconnaissance de l'antigène par le TCR ¹⁴⁸. De nombreux récepteurs et ligands ont ensuite été identifiés selon leur homologie de structure, tels que PD-L1 (CD274 ou B7-H1), PD-L2 (CD273 ou B7-DC), B7-H2 [CD275 ou ICOS-L (*Inducible T-Cell Costimulator Ligand*)], B7-H3 (CD276), B7-H4 [B7S1 (*B7 Superfamily Member 1*) ou B7x ou VTCN1 (*V-Set Domain Containing T Cell Activation Inhibitor 1*)], B7-H5 (VISTA ou GI24), B7-H6, B7-H7 (HHLA2, *HERV-H LTR-Associating 2*) et BTNL2. Les gènes codant ces protéines sont localisés sur des chromosomes différents ¹⁶⁸ : B7-1, B7-2 et B7-H7 (chromosome 3), PD-L1 et PD-L2 (chromosome 9), B7-H2 (chromosome 21), B7-H3 (chromosome 15), B7-H4 (chromosome 1), B7-H5 (chromosome 10), B7-H6 (chromosome 11) et BTNL2 (chromosome 6) chez l'Homme.

Ces protéines sont retrouvées sous forme d'homodimères, exceptée B7-2 qui agit en monomère, et elles possèdent des affinités variables pour leurs récepteurs. A titre d'exemple, B7-1 est plus affin pour CTLA-4 que B7-2 ; cela peut s'expliquer car B7-1 est un homodimère, donc deux molécules se lient au récepteur, alors que B7-2 agit en monomère. De même, PD-L2 est deux à six fois plus affin que PD-L1 pour PD-1 ¹⁶⁸.

4.2. Description et rôles immunologiques des membres B7

4.2.1. Différents groupes de protéines B7

Les protéines B7 sont classiquement divisées en 3 groupes, selon leurs récepteurs présents à la surface des lymphocytes T et définis suite à des analyses phylogénétiques ^{173,174}. Les membres B7-H5, B7-H6 et BTNL2 sont à ce jour non classés. Le **Tableau 5** ci-dessous résume les profils d'expression et les différentes fonctions immunologiques de ces molécules.

EXPRESSION

FONCTIONS IMMUNOLOGIQUES

MEMBRES NON CLASSÉS

B7-H6	<p>Absente dans les tissus sains Surexprimée dans les tumeurs solides et hémopathies ¹⁷²</p> <p>Induite par :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Cytokines proinflammatoires IL-1β et TNF-α ▪ HDAC-2 et -3 (Histone Déacétylase 2/3) ▪ Oncogène c-Myc ▪ Radiothérapie, thérapies par cytokines ou chimiothérapies <p>Existence d'une isoforme soluble [générée suite à un clivage par les disintégrines et les MMPs (Métalloprotéinase matricielle)]</p>	<p>Ligand du récepteur activateur des NK : NKp30 ¹⁷² Sensibilité les cellules tumorales à la cytolyse par les NK</p> <p>Elévation significative des niveaux de B7-H6 solubles chez les patients atteints de mélanome de stade IV, associée à dysfonction des cellules NK : <i>NK éliminent cellules tumorales B7-H6⁺ par cytotoxicité directe ou par sécrétion de cytokines. Donc B7-H6 soluble entrave la reconnaissance par les NK de B7-H6 membranaire à la surface des cellules tumorales.</i></p> <p>Cancer de l'ovaire : expression B7-H6 (principalement membranaire et cytoplasmique) corrélée avec statut métastatique et taux survie globale diminué ¹⁷²</p>
Les membres B7-H5 (VISTA) et BTNL2 ont déjà été décrits dans le Tableau 4 .		

MEMBRES DU GROUPE 1

B7-1 (CD80) B7-2 (CD86)	<ul style="list-style-type: none"> - Inductible sur CPAs et tissus lymphoïdes (LT, LB, DC, mo, mac, mastocytes) - Rare sur tissus non-lymphoïdes - B7-1 : podocytes, fibroblastes et ostéoblastes ¹¹⁹ - Chimiothérapie Ara-C (Cytosine arabinoside) \nearrow expression B7-1 et B7-2 <i>in vivo</i> ¹⁷⁵ 	<ul style="list-style-type: none"> - Récepteurs : CD28, CTLA-4 (et PD-L1 pour B7-1) - Signal co-inhibiteur des cellules T si liaison avec CTLA-4 - Signal co-activateur des LT naïfs si interaction avec CD28 - CTLs B7-1⁺ et B7-2⁺ : \nearrow éradication des cellules murines malignes - Expression insuffisante pour engendrer une immunité anti-tumorale effective ; nécessité de thérapies ¹⁷⁰.
B7-H2	<ul style="list-style-type: none"> - LT, LB, DC, mo, mac et mastocytes ¹¹⁹ - Cellules endothéliales, épithéliales, fibroblastes et ostéoblastes ¹¹⁹ 	<ul style="list-style-type: none"> - Récepteur co-activateur : ICOS (<i>Inducible Costimulator</i>) - \nearrow prolifération des LT CD4⁺ et production IL-4 et IL-10 ¹¹⁹ - Souris B7-H2⁻ ou ICOS-déficientes exhibent LT CD4⁺ dysfonctionnels ¹¹⁹

MEMBRES DU GROUPE 2

PD-L1 (CD274) PD-L2 (B7-DC)	<ul style="list-style-type: none"> - LT, LB, DC, mo, mac, mastocytes, cellules épithéliales, endothéliales et tumorales ¹¹⁹ - PD-L1 également retrouvée dans les NK, fibroblastes, ostéoblastes, cellules souches mésenchymateuses, ilots du pancréas, le stroma et les syncytiotrophoblastes ¹¹⁹ - Formes solubles sécrétées par les cellules tumorales et immunes ¹¹⁹ 	<ul style="list-style-type: none"> - Récepteur commun : PD-1 (exprimé sur LT activés, LB, NKT, monocytes et cellules dendritiques) ¹⁵⁵ + B7-1 pour PD-L1 et RGMB pour PD-L2 - Engagement PD-1 \searrow réponse induite par TCR ou BCR: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Permet une tolérance immunitaire périphérique ¹¹⁹ ▪ Responsable de la dysfonction des LT ¹⁷⁶ - Interaction PD-L1/B7-1 induit et maintient la tolérance périphérique ^{158,177} - Des récepteurs encore non identifiés de ces ligands existent et engendrent une activation de la réponse lymphocytaire T <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> ^{119,170,178}
--	---	--

MEMBRES DU GROUPE 3

B7-H3 (CD276)	<ul style="list-style-type: none"> - Récepteur(s) inconnu(s). - Récepteur hypothétique : TLT-2 (<i>TREM-Like Transcript 2</i>) mais d'autres études ne confirment pas l'interaction ¹¹⁹ <p>Valeur pronostique : ¹⁷²</p> <ul style="list-style-type: none"> - Corrélation positive entre l'expression tumorale de B7-H3 et la survie prolongée (cancer gastrique et cancer pancréas) - Mauvais pronostic dans les carcinomes rénal et colorectal, les cancers de la prostate, du poumon, de la vésicule biliaire, de l'œsophage, du col de l'utérus, du sein et les ostéosarcomes. <p>⇒ <i>Etudes discordantes peuvent être dues aux différents profils de glycosylation et/ou expression des isoformes.</i></p> <p>Fonctions lignée- et contexte- dépendantes : ¹⁷²</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>Fonctions co-activatrices :</p> <ul style="list-style-type: none"> ↗ immunogénicité (rejet tumoral plus rapide) ↗ prolifération des LT ↗ activation des CTLs </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>Fonctions co-inhibitrices :</p> <ul style="list-style-type: none"> ↘ immunité anti-tumorale ↘ réponse T </td> </tr> </table> <p>Régulation de ses fonctions : ¹⁷²</p> <ul style="list-style-type: none"> - Différences de fonctions entre les isoformes inconnues. - ↗ des taux de la forme sérique de B7-H3 chez les patients atteints de cancer du poumon, de carcinomes colorectal, hépatocellulaire, rénal ou de gliome, par rapport aux individus sains. - Glycosylation aberrante ↗ l'interaction des cellules de carcinome épidermique gingival Ca9-22 avec les cellules immunitaires ¹⁷⁹ - Dans cancer du colon, sa localisation nucléaire est associée à la présence de métastases et survie globale diminuée ¹⁸⁰. 	<p>Fonctions co-activatrices :</p> <ul style="list-style-type: none"> ↗ immunogénicité (rejet tumoral plus rapide) ↗ prolifération des LT ↗ activation des CTLs 	<p>Fonctions co-inhibitrices :</p> <ul style="list-style-type: none"> ↘ immunité anti-tumorale ↘ réponse T
<p>Fonctions co-activatrices :</p> <ul style="list-style-type: none"> ↗ immunogénicité (rejet tumoral plus rapide) ↗ prolifération des LT ↗ activation des CTLs 	<p>Fonctions co-inhibitrices :</p> <ul style="list-style-type: none"> ↘ immunité anti-tumorale ↘ réponse T 		
B7-H4	<ul style="list-style-type: none"> - Expression ubiquitaire de deux transcrits (un long et un tronqué) ¹¹⁹ - Expression protéique limitée dans tissus normaux (DC, mo, mac, cellules souches mésenchymateuses) ¹¹⁹ - Surexpression dans les tumeurs et le stroma ¹¹⁹ - Forme soluble dans le serum de patients atteints de cancer de l'ovaire. <ul style="list-style-type: none"> - Récepteur inconnu mais études suggèrent qu'il est surexprimé sur cellules T activées et MDSCs ¹¹⁹ - Localisation de surface, cytoplasmique et nucléaire. - Forme soluble ↗ dans modèles d'auto-immunité sévères. - Corrélation à un mauvais pronostic et une survie diminuée ¹¹⁹ <p>Fonctions co-inhibitrices : ^{119,172,181}</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ ↘ prolifération, sécrétion cytokines et fonctions cytotoxiques des LT ; ↗ mort par apoptose des LT ▪ ↗ prolifération des Tregs, sécrétion d'IL-10 et TGF-β ▪ Expression sur macrophages supprime l'activité des LT 		

B7-H7	<ul style="list-style-type: none"> - Transcrits fortement exprimés dans les intestins, reins et poumons - Exprimée sur les monocytes, macrophages et LB ¹¹⁹ - Surexpression dans de nombreux cancers. <ul style="list-style-type: none"> - Fonctions co-stimulatrices des cellules T : ¹¹⁹ <ul style="list-style-type: none"> ▪ Après interaction avec son récepteur co-stimulateur TMIGD2 (<i>Transmembrane And Immunoglobulin Domain Containing 2</i>), exprimé sur LT naïves, NK, cellules endothéliales et épithéliales ¹¹⁹ ▪ ↗ prolifération des LT CD4⁺ et production de cytokines (IL-2, IFN-γ, TNF-α et IL-10). - Fonctions co-inhibitrices : ¹¹⁹ - ↘ prolifération LT CD4⁺ et CD8⁺ et production de cytokines (IFN-γ, TNF-α, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A et IL-22) <ul style="list-style-type: none"> ⇒ Suggère l'existence d'un second récepteur. - Corrélation avec amplification génique ; associée à un haut risque de développer métastases et cancer invasif dans TNBC (<i>Triple Negative Breast Cancer</i>) ¹¹⁹
--------------	---

Tableau 5: Description et rôles immunologiques des membres des groupes 1, 2, 3 et non classifiés de la famille B7.

En conclusion, les profils d'expression et fonctions immunologiques de ces protéines B7 sont relativement similaires. Les domaines protéiques étant bien conservés entre ces différents membres B7, ils pourraient être à l'origine de ces similitudes fonctionnelles. En effet, le domaine extracellulaire de PD-L1 possède 20% d'homologie avec celui de B7-1 et 15% avec celui de B7-2. Par ailleurs, ce domaine contient trois résidus potentiellement glycosylables (aa35, aa200 et aa219) ainsi qu'un résidu glycosylé (aa192) ¹⁸². Le domaine trans-membranaire est quant à lui identique pour toutes les molécules B7, avec la présence de 4 résidus cystéine formant des ponts disulfure entre les régions *IgV-like* et *IgC-like*. Enfin, le domaine cytoplasmique, dont la fonction reste inconnue à ce jour ¹¹⁹, est bien conservé parmi les différentes espèces et est identique pour les différents membres B7 ¹⁴⁸.

Nous allons maintenant nous intéresser de manière plus détaillée à la protéine PD-L1, membre du groupe 2.

4.2.2. La protéine PD-L1 (B7-H1)

4.2.2.1. Structure et isoformes protéiques de PD-L1

La protéine trans-membranaire PD-L1 (*Programmed Death-Ligand 1*), aussi connue sous le nom de B7-H1 (*B7 homolog 1*) ou CD274 (*Cluster of differentiation 274*) est codée par le gène *CD274* présent sur les chromosomes 9 chez l'Homme ¹⁶⁸ et 19 chez la souris ¹⁸³. Ce gène comprend sept exons. Le premier, non codant, correspond à la partie 5'UTR. Les trois exons suivants codent la séquence signal et les domaines extracellulaires *IgV-like* et *IgC-like*. Les domaines trans-membranaire et intracellulaire sont quant à eux codés par les exons 5 et 6, respectivement. Enfin, l'exon 7 code la partie terminale du domaine intracellulaire et contient la séquence 3'UTR ¹⁷⁶.

Le transcrite de PD-L1 est exprimé par les cellules hématopoïétiques (CPAs, LB, macrophages, DCs, LT, monocytes et NK) mais également par les cellules non-hématopoïétiques, dont les cellules épithéliales, endothéliales, cardiaques et pulmonaires^{120,155}. Sur les cinq variants d'épissage recensés, seuls deux codent des isoformes protéiques 1 et 2, trans-membranaires. Il existe une troisième isoforme protéique issue d'un clivage protéolytique (**Figure 4**).

Isoforme protéique 1

L'isoforme 1 ou isoforme longue, comporte 290 acides aminés et fait 33,3 kDa. Elle comporte une séquence signal de 18 acides aminés, un domaine extracellulaire comprenant les régions *IgV-like* et *IgC-like* de 221 acides aminés, un domaine trans-membranaire de 21 acides aminés, ainsi qu'un domaine intracellulaire court, de 30 acides aminés.

Isoforme protéique 2

L'isoforme 2 est tronquée en partie extra-membranaire au niveau du domaine *IgV*, et comporte 176 acides aminés (soit 20,2 kDa). Localisée au niveau des membranes intracellulaires, elle est dans l'incapacité d'interagir avec le récepteur PD-1^{119,184}. Seul un rôle de régulation négative de l'expression de surface de l'isoforme 1 a été décrit à ce jour¹⁸⁵.

Isoforme protéique 3

Il existe une forme soluble de PD-L1, produite par les cellules cancéreuses suite au clivage de l'isoforme 1 par une métalloprotéinase et détectée dans le sérum de patients¹⁸⁶. A ce jour, le site exact de clivage reste inconnu. Cette isoforme de 178 acides aminés (soit 20,4 kDa) n'est donc pas le résultat d'un épissage alternatif : elle conserve son domaine extracellulaire et de ce fait, sa capacité d'interaction avec le récepteur PD-1¹⁸⁶. Ce facteur soluble peut également être sécrété par des cellules dendritiques matures activées suite à une réponse immunitaire innée¹⁸⁷. Il possède une valeur pronostique défavorable en jouant un rôle dans l'inhibition de la réponse T en induisant la mort par apoptose de ces cellules de l'immunité¹⁸⁶. Une étude récente confirme ces données, puisqu'elle est retrouvée en quantité plus importante dans le plasma de patients atteints de DLBCL (*diffuse large B-cell lymphoma*) par rapport aux sujets sains ; elle est associée à un mauvais pronostic avec une agressivité tumorale accrue. Les patients en rémission complète ont un niveau d'expression plus faible de cette isoforme que lors du diagnostic¹⁸⁸.

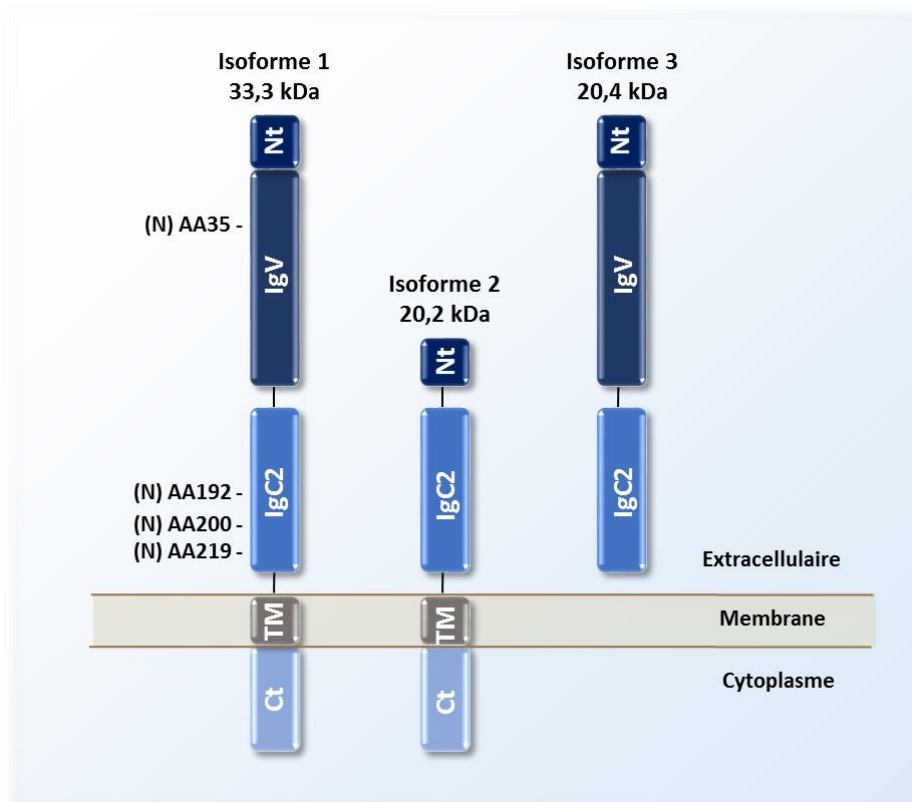


Figure 4: Représentation schématique des différentes isoformes protéiques de PD-L1 chez l'Homme.

Les acides aminés 35, 200 et 219 sont potentiellement N-glycosylables ; l'AA192 a été décrit comme glycosylé.

4.2.2.2. Expression de PD-L1 et sa régulation

4.2.2.2.1. Expression de PD-L1

Si le transcrit *PD-L1* est exprimé de façon ubiquitaire, les tissus humains normaux n'expriment que rarement la protéine à leur surface de manière constitutive, à l'exception des amygdales, du placenta et d'une petite fraction de macrophages présents dans le foie et les poumons, suggérant une forte régulation post-transcriptionnelle^{120,155}. La signalisation PD-1/PD-L1 contribue à l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire. Aussi, la protéine PD-L1 peut être exprimée constitutivement à la surface de cellules immunes telles que les LT, LB, cellules dendritiques, macrophages, monocytes, MDSCs et Tregs¹⁷⁶. Récemment, il a été montré que les protéines CMTM4 et CMTM6 (*CKLF Like MARVEL Transmembrane Domain Containing 4/6*) régulent cette expression de surface : non nécessaire pour la maturation de PD-L1, une colocalisation de ces protéines avec PD-L1 est retrouvée au niveau de la membrane plasmique et dans les endosomes, où elles empêchent la dégradation lysosomale de cette molécule B7^{189,190}.

PD-L1 à la surface des CPAs favorise la génération de Tregs périphériques et leur rôle immuno-suppressif, en engendrant la production d'IL-10, IFN- γ et de médiateurs cytotoxiques tels que le granzyme B^{155,191}. Enfin, son expression à la surface de tissus

lymphoïdes et non lymphoïdes peut être induite par des facteurs du micro-environnement dont l'IFN- γ , le TNF- α (*Tumor necrosis factor alpha*) et des cytokines comme l'IL-2, IL-4, IL-15, IL-21 et l'IFN de type I ^{119,155,192}.

Contrairement à une condition physiologique, une situation pathologique peut provoquer une expression aberrante de cette protéine. En effet, PD-L1 est largement exprimée à la surface des cellules cancéreuses, dans le cas d'hémopathies malignes et de tumeurs solides ¹⁵⁵, mais aussi lors d'infections virales chroniques. Le micro-environnement tumoral semble jouer un rôle essentiel dans l'expression de PD-L1 ; en outre, si la majorité des lignées cellulaires tumorales sont PD-L1-négatives en surface *in vitro*, une forte expression est retrouvée au niveau d'échantillons tumoraux issus de patients ^{120,155}. Ces différences peuvent s'expliquer par la présence dans le milieu tumoral de facteurs sécrétés par les cellules stromales ou par les cellules cancéreuses elles-mêmes, par exemple l'IFN- γ , le TGF- β et Fas ligand, permettant l'expression de PD-L1 ¹⁹².

4.2.2.2. Régulation de l'expression de PD-L1

L'expression de PD-L1 est régulée au niveau transcriptionnel et traductionnel ¹⁹³. Le promoteur du gène *CD274* codant PD-L1 contient deux sites de liaison à IRF-1 (*Interferon Regulatory Factor*), un site de liaison à STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) et un pour NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa B*). Aussi, le rôle immuno-suppresseur de l'IFN- γ passe par l'induction du facteur de transcription IRF-1 alors que le TNF- α et le LPS impliquent la voie NF- κ B ¹¹⁹. La régulation de l'expression de PD-L1 par STAT3 a été mise en évidence dans le cas du cancer du poumon. D'autres facteurs de transcription pourraient avoir un rôle similaire, comme FOXA1 (*Forkhead Box A1*), induit par l'IFN- β ^{119,192}.

L'expression de PD-L1 est également modulée par les microARN (miR). En effet, les miR-513 et miR-200 se lient à la région 3'UTR du transcrite codant PD-L1 et inhibent son expression, alors qu'une sous-expression de miR-513 par l'IFN- γ contribue à son induction ¹¹⁹. De même, la répression de miR-200 dans les cellules tumorales augmente l'expression de PD-L1 ¹¹⁹. D'autre part, la signalisation de l'IFN- γ étant contrôlée par les voies JAK (Janus Kinase)/STAT, MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) et PI3K/AKT, celles-ci sont donc importantes dans la régulation de l'expression de PD-L1 ; cela explique que l'inhibition des protéines adaptatrices MyD88 (*Myeloid Differentiation Primary Response 88*), TRAF6 (*TNF Receptor Associated Factor 6*) et MEK dans diverses lignées cellulaires diminue l'expression PD-L1 induite par l'IFN- γ et les ligands TLR (*Toll-Like Receptor*) ¹⁹⁴. De plus, la perte de PTEN contribue à l'expression de PD-L1 en induisant l'activation des voies PI3K/AKT et mTOR ¹⁹².

Dans le cas de cellules tumorales, de multiples mécanismes renforcent l'expression de PD-L1, dont la présence de cytokines dans le micro-environnement tumoral, des mutations chromosomales à gain de copies, une infection virale (par exemple EBV, *Epstein Barr Virus*) ou des mutations dans les sites de liaison des microARNs ¹¹⁹. A titre d'illustration, la région du chromosome codant PD-L1 étant souvent amplifiée dans certains types tumoraux, tels que le lymphome de Hodgkin et le lymphome médiastinal à large cellules B, cela conduit à une expression constitutive élevée de cette protéine ainsi qu'à une absence de réponse aux thérapies ciblant l'axe PD-1/PD-L1 ¹¹⁹.

Enfin, un environnement hypoxique favorise également l'expression de PD-L1. Le facteur de transcription HIF-1 α (*Hypoxia inducible factor 1-alpha*) peut se fixer à la séquence HRE2 (*Hypoxia Response Element 2*) située au niveau de l'intron localisé entre les exons 4 et 5 du gène *CD274*. L'hypoxie induit ainsi la résistance des cellules tumorales à la lyse médiée par les CTLs par un mécanisme dépendant de HIF-1 α , PD-L1 et PD-1 ¹⁹⁵.

4.2.2.3. PD-1 et B7-1, protéines B7 interagissant avec PD-L1

La protéine PD-L1 est un ligand du récepteur lymphocytaire co-inhibiteur PD-1 (CD279), exprimé à la surface des LT CD4⁺, CD8⁺, cellules T périphériques, cellules B mais aussi sur les cellules NK, DCs et les monocytes ¹¹⁹. L'interaction entre ces deux molécules est nécessaire pour induire les fonctions immuno-suppressives de PD-L1 ¹⁵⁶. En effet, lorsque des cellules tumorales ou infectées PD-L1⁺ interagissent avec des cellules T cytotoxiques activées, celles-ci sont alors inactivées. Ainsi, cet axe PD-1/PD-L1 est impliqué dans le maintien de la tolérance périphérique des cellules T en atténuant l'auto-immunité et en régulant l'homéostasie, et peut conduire au développement tumoral (**Figure 5**). Cela explique que des patients atteints de cancer à un stade avancé et ne répondant pas aux thérapies classiques ont un bon taux de réponse aux anticorps bloquant cette voie ¹⁹³.

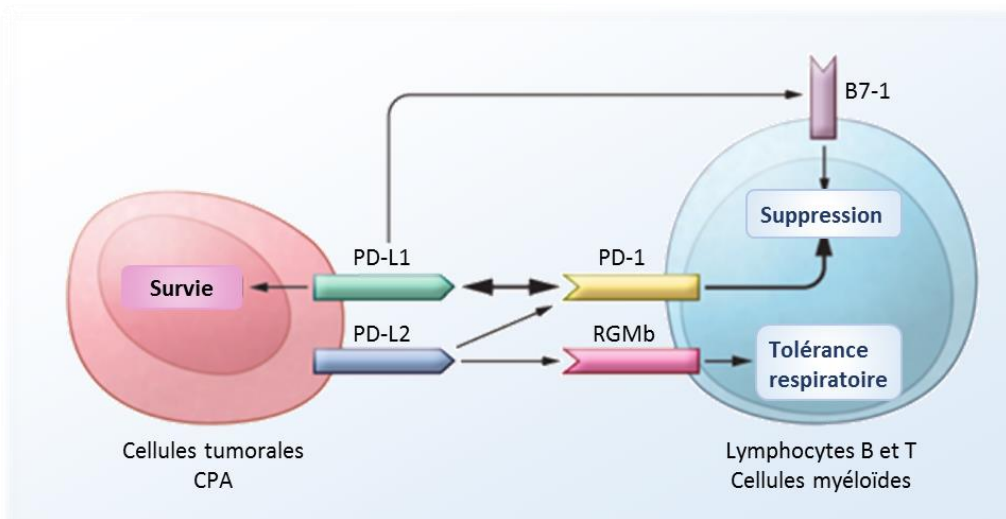


Figure 5 : Interactions PD-1/PD-L1 et PD-L1/B7-1.

Les protéines PD-L1 et PD-L2, avec différents profils d'expression à la surface des cellules tumorales ou CPA, ont été identifiées comme ligands de PD-1, et l'interaction de ces molécules avec le récepteur PD-1 induit la suppression des lymphocytes T. PD-L1 peut également interagir avec B7-1 sur les cellules T activées et inhiber leur activité. PD-L2 possède un second récepteur, RGMb. Si cette interaction active dans un premier temps les lymphocytes T, elle engendre ensuite une tolérance respiratoire. Enfin, PD-L1 à la surface des cellules tumorales peut agir en tant que récepteur suite à son interaction avec PD-1 et protéger les cellules tumorales de la lyse cytotoxique. Adapté de ¹⁵⁵.

Bien que de multiples études aient démontré des fonctions inhibitrices pour les ligands de PD-1, PD-L1 et PD-L2, d'autres ont indiqué une stimulation de la prolifération lymphocytaire et de leur production de cytokines ¹²⁰. Aussi, l'ajout de protéine recombinante PD-L1-Ig dans le milieu de culture augmente les réponses des cellules T CD4⁺ et l'immunité humorale dépendante des cellules T *helper* ¹⁵⁵. Ces données contradictoires suggèrent donc l'existence d'un second récepteur exprimé à la surface des lymphocytes. Cette hypothèse s'appuie notamment sur les résultats de l'étude menée par Wang *et al.*, en 2003 : en utilisant des modèles tridimensionnels et de mutagenèse spécifique, ils ont démontré que les mutants de PD-L1 ayant des caractéristiques altérées de liaison avec PD-1 sont encore capables d'induire la co-stimulation des lymphocytes T. Ces mutants stimulent également les lymphocytes T PD-1-déficients ¹⁵⁹. Ce n'est qu'en 2007 qu'a été mise en évidence l'interaction entre les protéines PD-L1 et B7-1 ; l'affinité entre ces deux molécules est intermédiaire (1,7 μ M) par rapport aux liaisons B7-1/CTLA-4 (0,2 μ M), B7-1/CD28 (4 μ M) et PD-L1/PD-1 (0,5 μ M) ¹⁵⁸. PD-L1 et B7-1 interagissent au niveau de leur domaine extracellulaire IgV-like, et engendrent un signal inhibiteur des lymphocytes T conduisant à une diminution de leur prolifération et de la sécrétion de cytokines ¹⁵⁶. Ces protéines étant toutes deux exprimées à la surface des lymphocytes T, lymphocytes B, cellules dendritiques et des macrophages, il existe donc au niveau de ces cellules une possibilité d'interaction bidirectionnelle.

L'existence de cette seconde interaction peut nous permettre de mieux comprendre certains résultats contradictoires obtenus *in vitro* suite à l'utilisation d'anticorps bloquants. En effet, si certains bloquent à la fois les interactions PD-1/PD-L1 et PD-L1/B7-1, d'autres en revanche inhibent uniquement l'une de ces deux interactions avec un effet moindre sur l'activation des lymphocytes.

4.3. Focalisation sur l'axe PD-L1/PD-1 et son rôle immunitaire

4.3.1. Activation de l'immunité

L'implication de la protéine PD-L1 dans la survie cellulaire des lymphocytes T cytotoxiques a été mise en évidence récemment, notamment lors de la phase de contraction des lymphocytes T CD8⁺, c'est-à-dire lorsque l'antigène cible a été éliminé et que la plupart des LT devenus inutiles meurent par apoptose. Pour environ 25% de ces lymphocytes, survient un pic d'expression de PD-L1 nécessaire à leur survie et donc à la génération de lymphocytes T mémoires ¹⁹⁶. Les auteurs ont utilisé un modèle murin transgénique TCR (OT-1) PD-L1 déficient. Les lymphocytes T CD8⁺ naïfs PD-L1-déficients ont une prolifération normale *in vitro* ¹⁹⁶. Cependant, dans leur phase d'activation suite à une stimulation par un antigène, leur taux de mort par apoptose *in vitro* est plus élevé et la phase de contraction plus importante *in vivo*, par rapport aux lymphocytes sauvages. En outre, les LT CD8⁺ PD-L1-déficients sont plus sensibles à l'apoptose Calcium-dépendante ou induite par FAS/FASL, avec une expression diminuée de la protéine anti-apoptotique BCL-xL ¹⁹⁶. Si l'expression de PD-L1 est essentielle à la survie de ces lymphocytes T, elle favorise également leur prolifération et la production de cytokines IL-10, IFN- γ et GM-CSF ¹⁹⁷. La réponse des cellules LT CD4⁺ est augmentée après traitement par une protéine recombinante PD-L1-Ig ¹⁹⁷.

De plus, dans un modèle murin DA1-3b/C3H de leucémie aiguë myéloïde, les souris vaccinées avec des cellules DA1-3b transduites avec CXCL10 développent une forte immunité systémique amenant à la guérison de la leucémie établie, sans persistance de cellules tumorales résiduelles. La chemokine CXCL10 est connue pour attirer les cellules T et NK ; l'effet protecteur du vaccin est abrogé *in vivo* suite à la déplétion des cellules NK et est partiellement inefficace en cas de déplétion en LT CD4⁺ ou CD8⁺. Dans le cas présent, la chimiokine CXCL10 induit une immunité anti-leucémique en stimulant l'expression de PD-L1 par les cellules NK, qui à leur tour favorisent la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ ainsi que la production d'IFN- γ et TFN- α . *In vivo*, le blocage de PD-L1 résultant de l'utilisation d'un anticorps monoclonal inhibe l'effet protecteur de la vaccination ¹⁷⁸. Ce rôle anti-tumoral de PD-L1 est contraire à celui observé lorsque cette protéine est exprimée à la surface des

cellules tumorales. En effet, dans ce même modèle murin, la surexpression de PD-L1 par les cellules leucémiques est liée à leur persistance dans l'hôte pendant une longue période, aussi appelée période de « dormance tumorale ».

4.3.2. PD-L1 et dormance tumorale

La dormance tumorale est caractérisée par la présence de cellules cancéreuses dans des organes spécifiques sans croissance de la tumeur ¹⁹⁸. Cliniquement, l'état de dormance correspond à la persistance dans l'organisme de cellules cancéreuses en très faible quantité après traitements, les rendant indétectables. On parle alors de « maladie résiduelle minimale » ⁵⁷. En effet, des sous-clones tumoraux vont développer des mécanismes de résistance aux traitements et au système immunitaire, induisant leur persistance malgré un environnement hostile ¹⁹⁹. Après une longue période de dormance, de plusieurs mois à plusieurs années, ces cellules peuvent être responsables d'une rechute ⁵⁷. Ce phénomène est observé dans certaines tumeurs solides mais aussi des hémopathies malignes.

Dans un modèle leucémique murin de dormance tumorale DA1-3b, des cellules leucémiques peuvent persister plus d'un an en très faible quantité (de 100 à 1000 cellules) après injection à des souris immuno-compétentes ⁶¹. Ces cellules « dormantes » sont capables d'induire une nouvelle leucémie après injection chez un hôte naïf. Proportionnellement à la durée de persistance de ces cellules dans l'hôte, l'expression augmentée des protéines PD-L1 et B7-1 pourrait expliquer leur résistance accrue à la lyse médiée par les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques des tumeurs ⁶¹. En effet, PD-L1, exprimée à la surface des cellules tumorales et ligand des deux protéines lymphocytaires PD-1 et B7-1, a initialement été décrite comme inhibitrice de la lyse médiée par les CTLs, protégeant ainsi les cellules malignes des réponses immunes ^{170,177}. Cela peut expliquer que le blocage *in vivo* de PD-L1 ou B7-1 suite à l'utilisation d'anticorps bloquant induit la prolongation de la survie des souris naïves injectées par des cellules résiduelles ⁶¹. Ces cellules développent également des mécanismes anti-apoptotiques afin de résister aux facteurs hostiles du micro-environnement, au système immunitaire et à différentes thérapies ^{57,200}. De plus, il a été montré que l'expression de SOCS1 (*Suppressor of cytokine signaling 1*) était diminuée de manière proportionnelle à la durée de la dormance, du fait de la méthylation du promoteur de son gène. Ce phénomène induit l'activation de la voie JAK/STAT ainsi qu'une surproduction d'IL-3 et contribue à la résistance de ces cellules résiduelles à la mort médiée par les CTLs et diverses thérapies (irradiations, cytarabine, imatinib) ²⁰⁰.

4.3.3. PD-L1/PD-1 et Immuno-suppression

4.3.3.1. Notion de « résistance adaptative »

L'immuno-échappement tumoral engendré par la voie PD-1/PD-L1 peut être qualifié de "résistance adaptative". Cette notion repose sur le fait que PD-L1, absente dans la plupart des tissus normaux, est à l'inverse exprimée de façon aberrante dans les tissus cancéreux suite à son induction par la cytokine pro-inflammatoire IFN- γ (**Figure 6**)^{120,155}.

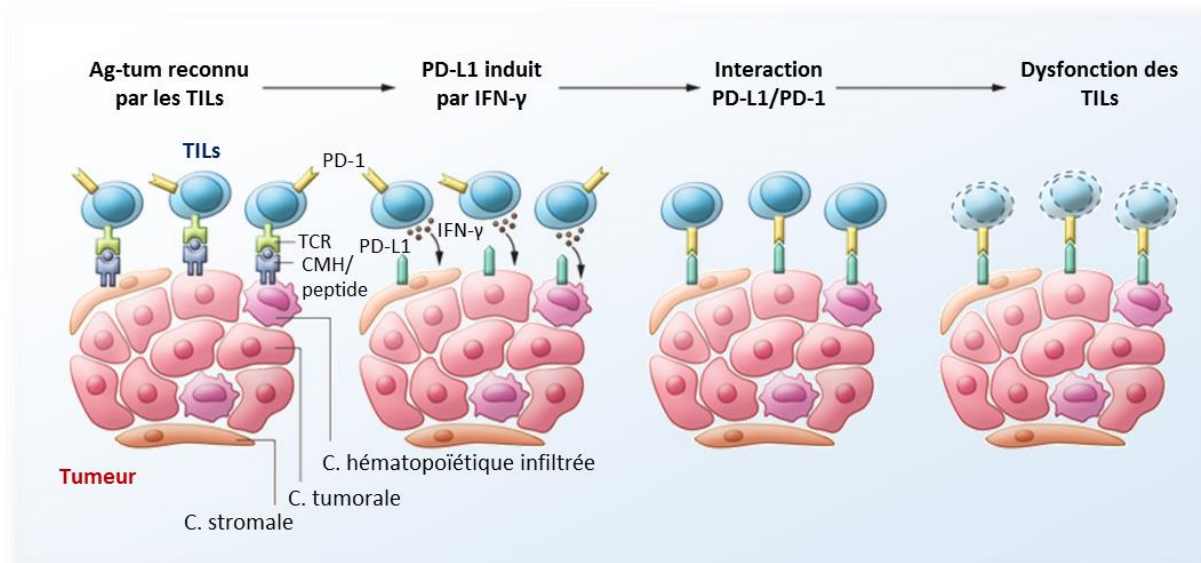


Figure 6 : Hypothèse de « résistance adaptative ».

Après activation dans les organes lymphoïdes, les cellules T spécifiques de la tumeur pénètrent dans le site tumoral pour devenir des TILs (lymphocytes T infiltrants la tumeur). Lors de la reconnaissance des Ag-tum (antigènes tumoraux), les TILs produisent de l'IFN- γ , qui entraîne l'expression de PD-L1 dans le micro-environnement tumoral. Les Ag-tum sont présentés à la surface des cellules tumorales, stromales et hématopoïétiques infiltrantes comprenant des cellules dendritiques, des macrophages, des neutrophiles et des lymphocytes B. Toutes ces cellules peuvent être induites pour exprimer PD-L1. Lors de son interaction avec le récepteur PD-1, PD-L1 délivre un signal suppressif aux cellules T et un signal anti-apoptotique aux cellules cancéreuses, conduisant à un dysfonctionnement lymphocytaire et à la survie tumorale. Adapté de¹⁵⁵.

La résistance adaptative peut être initiée suite à la reconnaissance d'antigènes tumoraux par les lymphocytes infiltrants les tumeurs (TIL). Ces antigènes peuvent être présentés par les cellules cancéreuses, par les cellules stromales ainsi que par des cellules hématopoïétiques infiltrées (DCs, macrophages, neutrophiles et lymphocytes). Lors d'une reconnaissance spécifique d'un antigène, les TILs sécrètent de l'IFN- γ qui induit l'expression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales cibles. Des études d'immunohistochimie ont montré que l'expression de PD-L1 en surface est détectée uniquement dans des cellules adjacentes aux lymphocytes T, soutenant ainsi cette notion de « résistance adaptative »²⁰¹. Alors que l'IFN- γ peut favoriser les fonctions effectrices des TILs en augmentant leur différenciation et en

stimulant la présentation antigénique par les cellules cibles¹⁵⁵, PD-L1 en surface se lie à ses récepteurs, PD-1 et B7-1, présents sur les lymphocytes T effecteurs et paralyse leur activité. Par conséquent, alors que la fonction physiologique de PD-L1 est d'empêcher la propagation de l'inflammation et de limiter les dommages tissulaires, son expression au niveau du micro-environnement tumoral supprime l'immunité anti-tumorale. L'hypothèse de résistance adaptative est également soutenue par une étude démontrant une forte corrélation entre l'expression de PD-L1 dans les lésions mélanocytaires humaines et la présence de TILs²⁰¹. De plus, l'IFN- γ a été détecté à l'interface des TILs et des cellules PD-L1⁺ mais est resté indétectable dans les tumeurs PD-L1⁺²⁰¹. Dans un modèle murin, la neutralisation de cette cytokine par un anticorps monoclonal anti-IFN- γ a supprimé la régulation positive de PD-L1 dans le micro-environnement tumoral, validant le rôle crucial de l'IFN- γ dans l'induction de PD-L1¹⁵⁵. Par conséquent, le mécanisme de « résistance adaptative » permet de mieux comprendre la stratégie mise en place par la tumeur lui permettant d'échapper à la destruction immune, malgré les réponses immunitaires anti-tumorales endogènes. Bien que l'IFN- γ soit un facteur majeur de la régulation positive de PD-L1, les cellules cancéreuses expriment également PD-L1 par un mécanisme intrinsèque, indépendant de cette cytokine. En effet, une fraction de cancers humains n'ayant pas de TILs au sein de leur micro-environnement expriment tout de même des niveaux élevés de PD-L1^{201,202}. Par exemple, son expression tumorale peut être régulée directement par la perte de PTEN, l'activation constitutive d'ALK (*anaplastic lymphoma kinase*) et par des mutations de l'EGFR (*Epidermal growth factor receptor*)¹⁵⁵. L'induction intrinsèque de PD-L1 est présente dans environ 1% des patients atteints de mélanome²⁰¹ et survient jusqu'à 12% des cas chez les patients atteints de cancer du poumon²⁰².

4.3.3.2. Mécanismes impliqués dans cette immuno-suppression

Ainsi, la protéine PD-L1 joue un rôle inhibiteur de la lyse des cellules tumorales provoquée par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Plusieurs mécanismes complexes sont impliqués dans cette inhibition (**Figure 7**)¹⁹³.

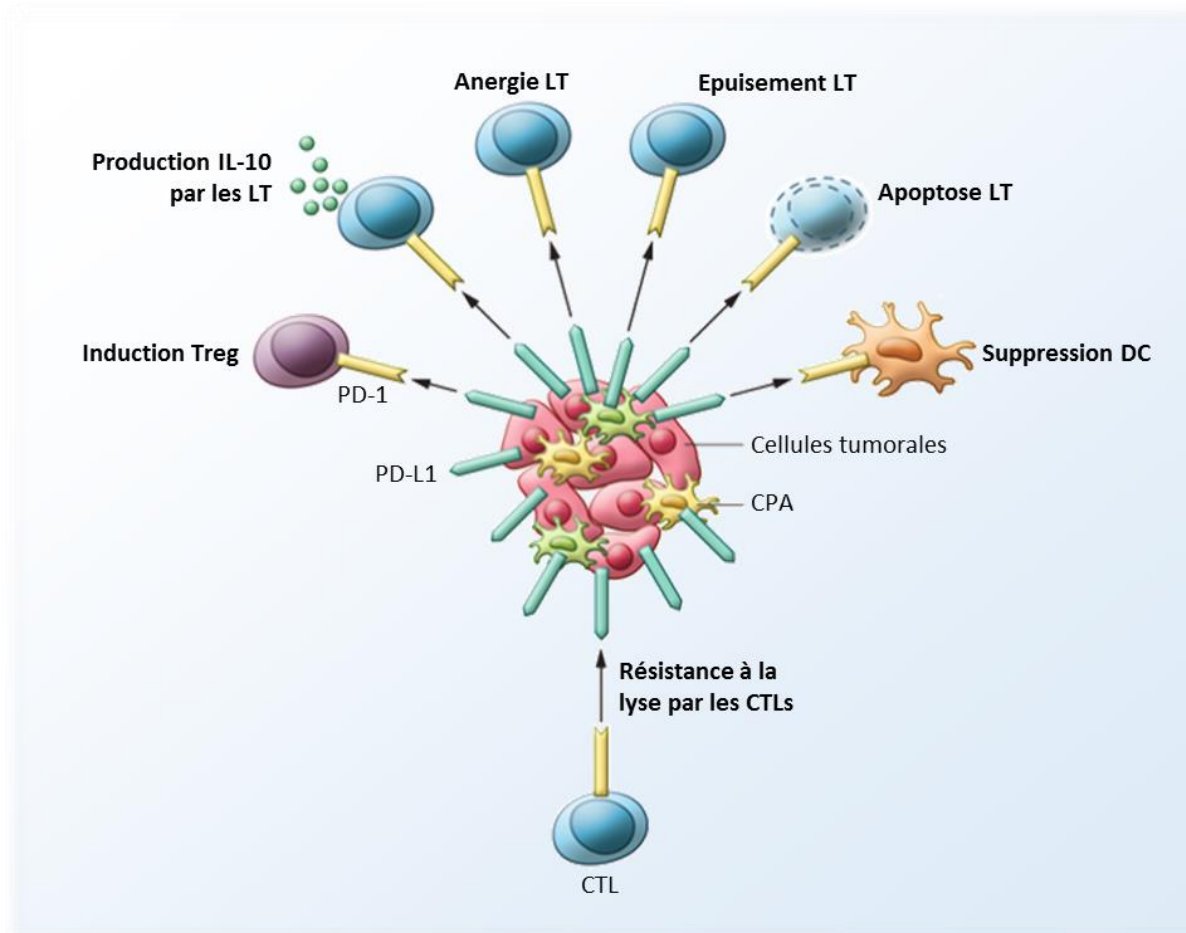


Figure 7 : Mécanismes d'immuno-suppression induits par l'axe PD-1/PD-L1 au sein du micro-environnement tumoral.

L'expression de niveaux élevés de PD-L1 par les cellules malignes et d'autres du micro-environnement tumoral entraîne une immuno-suppression après interaction avec son récepteur PD-1 via plusieurs mécanismes. En effet, les cellules tumorales et CPA PD-L1⁺ peuvent induire l'apoptose, l'anergie et l'épuisement des cellules T, ainsi que la production d'IL-10. Ces cellules médient également la suppression des cellules dendritiques (DC) et engendrent la différenciation des Tregs. Enfin, PD-L1 peut aussi agir comme bouclier moléculaire sur les cellules tumorales et les protéger de la lyse par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Adapté de ¹⁵⁵.

4.3.3.2.1. Apoptose, anergie et épuisement des lymphocytes

Les cellules tumorales surexprimant la protéine PD-L1 entraînent une augmentation du taux d'apoptose des lymphocytes T activés, alors que l'utilisation d'un anticorps bloquant anti-PD-L1 favorise l'immunité anti-tumorale en réduisant ce mécanisme de mort ¹²⁰. L'apoptose des lymphocytes T est un phénomène physiologique indispensable au maintien de l'homéostasie des tissus périphériques : en effet, des souris PD-L1-KO ont une accumulation de LT CD8⁺ au niveau du foie, liée à la diminution du taux d'apoptose ¹⁵⁷. L'engagement de PD-1 suite son interaction avec PD-L1 réduit la survie des lymphocytes T en impactant les gènes apoptotiques, par exemple en inhibant l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-xL et en favorisant celle du facteur pro-apoptotique BIM ¹⁹³.

D'autre part, dans un modèle d'infection par l'EBV, l'activation fonctionnelle de PD-L1 à la surface des lymphocytes B après utilisation d'un anticorps anti-PD-L1 ou d'une protéine recombinante PD-1-Ig diminue la prolifération de ces cellules infectées et induit leur apoptose en perturbant le métabolisme mitochondrial et la production de ROS ; cela permet par ailleurs l'expression de surface du ligand FASL. Dans ce cas, l'activation de PD-L1 provoque l'apoptose des cellules B adjacentes exprimant le récepteur de mort FAS par un mécanisme FAS/FASL. On peut supposer que ce processus d'induction de mort des lymphocytes B infectés par EBV peut également être mis à profit par les tumeurs²⁰³.

Un second mécanisme consiste en l'induction de l'anergie des cellules T, phénomène d'inactivation provoqué par la reconnaissance d'antigènes sans signaux de co-stimulation associés. De ce fait, cela se traduit par un état de non-réponse du lymphocyte concerné. Aussi, il a été montré que la co-culture de lymphocytes T alloréactifs avec des cellules dendritiques exprimant PD-L1 induit leur anergie ; cet effet est réversible suite à l'ajout dans le milieu d'anticorps monoclonaux anti-PD-L1²⁰³. Il est donc probable que la persistance des cellules tumorales exprimant PD-L1 soit favorisée suite à l'induction de l'anergie, l'inactivation ou la tolérance des TILs^{157,203}.

Le mécanisme d'épuisement des lymphocytes T a initialement été décrit dans des cas d'infections virales chroniques, notamment suite à la stimulation continue de PD-1 par son ligand PD-L1. A l'inverse, le blocage de PD-L1 avec un anticorps monoclonal restaure l'activité des cellules T^{157,204}. Lors de pathologies cancéreuses, également considérées comme des pathologies inflammatoires chroniques, le blocage de PD-L1 améliore l'activation des cellules T par les cellules dendritiques et s'accompagne d'une régulation négative de l'IL-10 ainsi que d'une élévation des taux d'IL-2 et d'IFN- γ . Par conséquent, la surexpression de PD-L1 à la surface des cellules dendritiques du micro-environnement tumoral réduit l'immunité anti-tumorale médiée par les cellules T¹⁵⁷. De plus, il est intéressant de noter que des blocages de PD-1 et de mucine-3, marqueur de l'épuisement des cellules T, réversent cet état et réduisent la croissance tumorale¹⁹³.

4.3.3.2.2. Production d'IL-10

En 1999, Dong *et al.* ont montré que la stimulation des lymphocytes T par la protéine PD-L1 et un anticorps anti-CD3 induit la production d'IL-10, interleukine anti-inflammatoire^{193,205}. De plus, comme indiqué précédemment, les cellules dendritiques surexprimant PD-L1 sécrètent de l'IL-10¹⁹³. Une corrélation positive entre le niveau d'expression de PD-L1 et le taux d'IL-10 dans le milieu a été mise en évidence dans le cas d'infections virales chroniques¹⁵⁷. En revanche, les mécanismes d'action de l'IL-10 dans l'inhibition de la lyse médiée par les lymphocytes T sont à déterminer.

4.3.3.2.3. Inactivation des autres cellules de l'immunité

En plus des lymphocytes T, l'axe PD-1/PD-L1 influence l'activation de diverses cellules immunes telles que les NK ²⁰⁶, lymphocytes B ²⁰⁷ et cellules dendritiques ²⁰⁸. Ainsi, les NK issus de patients atteints de myélome multiple expriment plus fortement PD-1 par rapport à ceux issus de donneurs sains. Dans ces cellules, le blocage de PD-1 par un anticorps monoclonal engendre une augmentation de la sécrétion de cytokines par les NK ^{193,206}. La voie PD-1/PD-L1 inhibe également l'action des lymphocytes B en supprimant la signalisation du BCR, ainsi que la sécrétion des cytokines IL-12 et TNF- α par les cellules dendritiques lors d'infections bactériennes ^{193,207,208}.

4.3.3.2.4. Rôle de « bouclier moléculaire »

La lyse de cellules tumorales par les lymphocytes T cytotoxiques est plus efficace lorsque l'expression de PD-L1 est faible que dans le cas de tumeurs surexprimant cette protéine ¹⁹³. En réalité, PD-L1 protège les cellules cancéreuses de la mort induite par FAS ou de la lyse par les CTLs, ce qui promeut la progression tumorale. Ce mécanisme de résistance aux lymphocytes T, appelé « *molecular shield* » ou « bouclier moléculaire », requiert le domaine intracellulaire de PD-L1 ¹⁶⁵. En effet, des études de mutagenèse dirigée ont montré que des mutations dans cette région entraînent la lyse des cellules cancéreuses par les lymphocytes T. A l'inverse, aucun effet n'est observé lorsque la partie extracellulaire du récepteur PD-1 est mutée ¹⁶⁵. D'autre part, l'utilisation d'anticorps bloquant anti-PD-L1 ou anti-PD-1 favorise une augmentation de la lyse des cellules cancéreuses par les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques, suggérant que l'expression de PD-L1 est suffisante pour permettre la résistance tumorale à la lyse provoquée par les CTLs ^{61,193}. De plus, l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales supprime la production de TNF par les cellules T CD8⁺ après stimulation antigénique, effet antagonisé par le blocage de PD-1. Ce mécanisme est donc une nouvelle stratégie mise en place par les cellules cancéreuses afin de résister à la lyse par les CTLs ²⁰⁹.

4.3.3.2.5. Induction de lymphocytes T régulateurs

La voie PD-1/PD-L1 est également impliquée dans la génération de cellules T régulatrices immuno-suppressives (Tregs). Les cellules présentatrices de l'antigène exprimant PD-L1 induisent les Tregs naturels (nTregs) dans le thymus et convertissent les cellules T CD4⁺ naïves périphériques en Tregs inductibles ; cela implique le TGF- β et résulte de la suppression de la voie AKT/mTOR. La protéine PD-L1 soutient simultanément la survie des Tregs inductibles et favorise leur activité immuno-suppressive en maintenant et induisant l'expression de FOXP3 ¹⁹³. De plus, l'engagement de PD-1 convertit les cellules Th1 CD4 matures en Tregs FOXP3⁺ ¹⁹³. L'expansion de nTregs générée par PD-1 est amplifiée par

une surexpression de PD-L1 pilotée par l'IFN- γ et par une signalisation inversée de CD80 exprimée sur les nTreg¹⁹³. Notons que l'utilisation d'anticorps anti-PD-L1 engendre l'inhibition des Tregs¹⁵⁷.

4.3.3.2.6. Mécanisme de compétition métabolique

Une compétition métabolique entre les cellules peut influencer leur croissance, survie et fonctions. Ce mécanisme existe entre les cellules du micro-environnement tumoral, notamment entre les cellules cancéreuses et immunitaires. Par exemple, les cellules malignes peuvent exprimer l'IDO, enzyme catalysant le métabolisme du tryptophane et responsable de l'inhibition de l'activité des cellules T^{99,100}. De plus, la sécrétion de lactate par les cellules tumorales et son accumulation dans le micro-environnement, résultat d'un métabolisme glycolytique accru, supprime également la prolifération et fonction des cellules T²¹⁰.

L'utilisation par l'équipe de Chang *et al.* d'un modèle de sarcome de souris, a montré que la consommation de glucose par les tumeurs restreint métaboliquement les lymphocytes T en atténuant leur activité dépendante de la voie mTOR, leur capacité glycolytique et la production d'IFN- γ ²¹¹. L'utilisation d'anticorps bloquants anti-CTLA-4, anti-PD-1 et anti-PD-L1, utilisés en clinique, restaurent le taux de glucose dans le micro-environnement tumoral et permettent la production d'IFN- γ . En outre, les auteurs ont constaté que le blocage de PD-L1 au niveau des tumeurs diminue la glycolyse en inhibant l'activité de mTOR et en réduisant l'expression de protéines impliquées dans la glycolyse, comme PDK1 (*Pyruvate Déshydrogénase Kinase 1*), HK2 (*Hexokinase 2*) et GLUT1 (*Glucose Transporter Type 1*)²¹¹. Ces données reflètent un rôle potentiel de PD-L1 dans la consommation et l'utilisation du glucose lors du développement tumoral et indiquent que des restrictions métaboliques imposées par la tumeur conduisent à l'hypo-réactivité des cellules T. L'engagement de PD-1 inhiberait la métabolisation du glucose et d'acides aminés par les lymphocytes T en diminuant leur expression de GLUT1 et l'activité AKT/mTORC1²¹². Des observations similaires ont été réalisées dans le cas de monocytes, pour lesquels une corrélation positive entre compétences glycolytiques et de phagocytose des cellules de leucémie lymphoïde chronique a été mise en évidence ; ces capacités seraient diminuées après activation de l'axe PD-1/PD-L1²¹³.

Par ailleurs, l'engagement de PD-1 permet la β -oxydation des lipides par les cellules T¹⁶⁰. Cet effet est dû à une augmentation de l'expression de CPT1A (carnitine palmitoyl transférase 1A) et de la lipolyse, indiquée par l'élévation de la lipase ATGL (*adipose triglyceride lipase*). L'amélioration de la β -oxydation peut fournir une explication mécanistique de la longévité des lymphocytes T engageant le récepteur PD-1 et de leur capacité à être réactivés suite au blocage de PD-1 par un anticorps¹⁶⁰.

Enfin, l'excès d'un intermédiaire de la glycolyse, le pyruvate, dans les mitochondries de macrophages, favorise l'expression de PD-L1 en activant la voie de signalisation BMP4 / p-SMAD1/5 / IRF1 (*Bone morphogenetic protein 4* / SMAD1/5 phosphorylé / *IFN regulatory factor 1*). Ces macrophages répondent à l'excès de nutriments en activant le point de contrôle immuno-inhibiteur PD-1/PD-L1, conduisant à une altération de l'immunité des cellules T ²¹⁴.

4.4. Fonctions non-immunologiques des protéines B7

Les protéines B7 permettent la co-stimulation du système immunitaire mais aussi l'immuno-échappement tumoral. Les membres co-stimulateurs, tels que B7-1, B7-2, B7-H2, B7-H3, B7-H6 et B7-H7, soutiennent la prolifération des lymphocytes T, leur production de cytokines et préviennent l'apoptose. A l'inverse, les protéines co-inhibitrices PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, B7-H5 et B7-H7 engendrent un signal limitant la réponse T et empêchent ainsi toute hyper-activation de ces cellules, susceptible d'être à l'origine de dommages tissulaires ¹⁵⁷. Notons que certaines de ces protéines ont un double effet, activateur et inhibiteur, selon le récepteur engagé et le contexte cellulaire. Le large profil d'expression de ces membres B7 est à l'origine de cette interaction dynamique entre le système immunitaire de l'hôte et la tumeur ^{119,157}. Plus récemment, des fonctions non-immunologiques conduisant à une progression tumorale ont été assignées à certaines de ces protéines et plus particulièrement PD-L1, B7-H3 et B7-H4 ¹⁷². Elles auraient un impact au niveau de la croissance tumorale, de la résistance à la mort cellulaire et aux chimiothérapies, des phénomènes de migration, invasion et du processus d'EMT (transition épithélio-mésenchymateuse), ainsi qu'au niveau du métabolisme des cellules malignes.

4.4.1. La croissance tumorale

Plusieurs études ont démontré l'importance des protéines B7 dans la croissance tumorale. Dans le cas du carcinome de la cavité buccale ¹⁷⁹ et des leucémies myélo-monocytaires aiguës ²¹⁵, l'inactivation de B7-H3 supprime la prolifération cellulaire, alors que la restauration de son expression favorise la croissance. A ce titre, l'utilisation d'un anticorps bloquant anti-B7-H3 (mAb 376.96) inhibe la croissance *in vitro* des cellules de carcinome ovarien ²¹⁶ ; cela pourrait être dû en partie à un arrêt des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire ²¹⁷. Similairement, la protéine B7-H4 promeut la prolifération de lignées cellulaires de carcinome rénal *in vitro* et leur tumorigénicité *in vivo*, en engendrant la surexpression des cyclines D et E impliquées dans la phase G1/S du cycle cellulaire ²¹⁸. Dans le cancer du poumon, B7-H4 soutient la prolifération cellulaire, l'invasion, la migration et régule la mort par

apoptose. Une déplétion de cette protéine suite à l'utilisation de shRNA (*small hairpin RNA*) s'accompagne d'une augmentation de l'expression des protéines BAX, caspase-3 et -8, ainsi que d'une diminution de BCL-2, de la cycline D1 et de l'activation d'AKT²¹⁹. Cette activité anti-apoptotique a été confirmée dans des lignées de cancer du sein²²⁰. Dans les cas de mélanome, carcinome oesophagien et cancer du pancréas, la croissance tumorale permise par B7-H4 serait plutôt due à la modulation des voies IL-6/STAT3 et ERK1/2^{221,222}

De manière surprenante, malgré que B7-H3 soit souvent associée à un mauvais pronostic, cette protéine a été décrite comme pouvant avoir un effet inverse et engendrerait une diminution de la croissance tumorale suite à une régulation négative de l'expression du facteur de croissance VEGF et de la micro-densité vasculaire²²³. Ces données suggèrent que l'effet de B7-H3 pourrait dépendre du contexte cellulaire ; d'autres études sont nécessaires afin de déterminer les mécanismes impliqués dans ces effets antagonistes.

Concernant la protéine PD-L1, Tamai *et al.* ont montré en 2014 que son expression à la surface de cellules de cholangiocarcinome régule négativement le phénotype de cellules souches. Dans ce modèle, les cellules exprimant faiblement PD-L1 sont les plus tumorigènes pour les souris immuno-déficientes NOG et possèdent une activité ALDH (Aldéhyde déshydrogénase) augmentée, une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) réduite ainsi qu'un cycle cellulaire en dormance (phase G0), caractéristiques des cellules souches²²⁴. Aussi, le profil d'expression génique de ces cellules PD-L1-négatives est semblable à celui des cellules souches cancéreuses (CSC), avec une expression augmentée des protéines SOX2 (*SRY-Box 2*), NANOG (*Nanog Homeobox*) et OCT4 (*Octamer-Binding Protein 4*). Dans le cholangiocarcinome, l'absence d'expression de PD-L1 est associée à un état dormant et à une valeur pronostic plus sombre²²⁴. De même, les cellules souches de cancer gastrique PD-L1⁺ ont un taux plus élevé du marqueur de prolifération Ki67 par rapport à leurs homologues exprimant faiblement PD-L1. La capacité proliférative de ces cellules est renforcée après l'activation de PD-L1 par une protéine PD-1 recombinante, *in vitro* et *in vivo*²²⁵. Des résultats contraires ont été obtenus dans le cas de cellules souches de cancer du sein où PD-L1 favoriserait l'expression d'OCT4 et NANOG en activant la voie PI3K/AKT et maintiendrait ainsi la sous-population souche capable de réinitier la tumeur. Ces données suggèrent que le ciblage de PD-L1 permettrait une meilleure efficacité des traitements du cancer du sein en affectant le pool de cellules souches cancéreuses²²⁶.

4.4.2. Résistance à la mort cellulaire et aux chimiothérapies

Les études s'intéressant au rôle de ces protéines B7 dans la résistance des cellules cancéreuses à la mort cellulaire et aux chimiothérapies sont récentes.

Une dérégulation des voies JAK2/STAT3 et PI3K/AKT serait responsable de cet effet de chimio-résistance. Effectivement, l'inhibition de B7-H3 dans des cellules cancéreuses de sein favorise leur sensibilité à l'apoptose induite par le paclitaxel. Cela se traduit par une abrogation de la phosphorylation de JAK2/STAT3, inactivant cette voie et réprimant l'expression des cibles anti-apoptotiques directes, MCL-1 et Survivine ²²⁷. En outre, l'activation de la voie JAK2/STAT3 induite par B7-H3 provoque la résistance à l'apoptose des cellules de cancer colorectal suite à l'expression de BCL-2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*) et BCL-xL ²²⁸. De la même manière, B7-H3 induit la résistance des cellules de carcinome pancréatique Patu8988 à la gemcitabine ²²⁹, des cellules myéloïdes U937 à l'idarubicine et la cytarabine ²¹⁵ et des cellules de lymphome du manteau Maver et Z138 au rituximab et à la bendamustine ²¹⁷.

La protéine B7-H3 peut également provoquer une dérégulation de la voie PI3K/AKT. Ainsi, l'inhibition de son expression augmente la sensibilité de cellules cancéreuses de sein triple négatives à des inhibiteurs de la voie AKT/mTOR, *in vitro* et *in vivo* ²³⁰. Il en est de même pour les cellules de mélanome métastatiques, dans lesquelles l'inactivation de B7-H3 engendre une prolifération ralentie, des capacités glycolytiques diminuées et une sensibilité accrue à la dacarbazine et aux inhibiteurs des voies MAPK et AKT/mTOR ²³¹. Enfin, l'activation de la voie PI3K/AKT par B7-H3 conduit à la résistance des cellules colorectales SW80 et HCT80 au 5-Fluorouracile (5-FU) ²³² et des cellules colorectales à l'oxaliplatine ²³³, en favorisant l'expression de l'enzyme TS (*thymidylate synthase*) et de XRCC1 (*X-Ray Repair Cross Complementing 1*), respectivement. Notons que l'enzyme TS, cible directe du 5-FU, est sur-exprimée dans de nombreux cancers et antagonise les effets cytotoxiques des agents chimiothérapeutiques ²³². De plus, une modulation de la voie PI3K/AKT a récemment été associée à la résistance de cellules de myélome PD-L1⁺ à l'apoptose et au melphalan, agent alkylant chimiothérapeutique, en favorisant l'expression de gènes liés au cycle cellulaire [*CCND3* (*Cycline D3*) et *CDK6* (*Cyclin Dependent Kinase 6*)] et anti-apoptotiques [*BCL2* et *MCL1* (*Myeloid Cell Leukemia 1*)] ²³⁴.

La protéine PD-L1 engendre la résistance à la mort des cellules cancéreuses en mettant en jeu d'autres mécanismes moléculaires. En effet, en 2008, l'équipe d'Azuma a démontré que cette molécule possède une fonction anti-apoptotique directe à la surface des cellules cancéreuses, par un mécanisme de signalisation reverse : PD-L1 peut agir en tant que récepteur. Les auteurs ont montré que les cellules tumorales surexprimant PD-L1 à leur surface résistent davantage à la lyse par les CTLs, en induisant un signal anti-apoptotique impliquant domaine cytoplasmique de 31 acides aminés. De plus, le taux d'apoptose provoqué par le ligand du récepteur de mort FAS ou par l'utilisation de staurosporine, un inhibiteur de protéine kinase, est diminué ¹⁶⁵. Par ailleurs, dans les néoplasies mammaires, PD-L1 permet la résistance des cellules tumorales aux anthracyclines ; ce phénomène

dépendrait de sa localisation nucléaire^{235,236}. Après traitement des cellules cancéreuses à la doxorubicine, l'expression de surface de la protéine PD-L1 diminue au profit d'une localisation nucléaire ; celle-ci serait dépendante du passage de la forme phosphorylée d'AKT dans le noyau. Lorsque l'expression de PD-L1 est diminuée par l'utilisation de siRNA (*small interfering RNA*), le niveau d'apoptose induite par la doxorubicine augmente. Cela indique un rôle anti-apoptotique de PD-L1²³⁶. Notons toutefois qu'un traitement avec d'autres chimiothérapies n'induit pas systématiquement une relocalisation nucléaire. La molécule B7-H4 permet aussi aux cellules de carcinome rénal Caki-1 et ACHN de résister aux anthracyclines, notamment à la doxorubicine et au docetaxel, mais les mécanismes moléculaires impliqués ne sont à ce jour pas élucidés²¹⁸.

4.4.3. Migration, invasion et processus EMT

Les processus de migration, invasion et la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) sont aussi impactés suite à l'expression de ces protéines B7.

L'invalidation de B7-H3 par siRNA dans des cellules de cancer pancréatique diminue la migration cellulaire et l'invasion de plus de 50% *in vitro*²³⁷. Ce phénomène est également observé pour des cellules de lymphome du manteau²¹⁷, de mélanome et de cancer du sein. Dans ces derniers cas, B7-H3 n'a curieusement pas d'effet sur la prolifération cellulaire²³⁸. Ainsi, B7-H3 contribue aux capacités métastatiques en augmentant l'expression de protéines associées au développement de métastases, comme la Métalloprotéinase matricielle-2 (MMP-2), STAT3 et l'Interleukine-8, ainsi qu'en diminuant les protéines *tissue inhibitor of metalloproteinase* (TIMP)-1 et -2²³⁹. La corrélation entre les expressions de B7-H3 et MMP-2 a été confirmée dans le cancer du pancréas. Similairement, l'activation par B7-H3 de la voie PI3K/AKT/STAT3 est en partie responsable de la migration et invasion des cellules de cancer de la vessie et de carcinome rénal, en promouvant l'expression de MMP-2 et -9^{240,241}. La forme soluble de B7-H3 favoriserait l'invasion et les métastases de cellules de carcinome pancréatique en activant la voie TLR4 (*Toll-Like Receptor 4*)/NF-κB qui engendre l'expression de l'IL-8 et du VEGF²⁴².

Concernant la protéine B7-H4, peu d'études ont été réalisées. Toutefois, il semblerait que cette molécule soit en faveur de la prolifération, l'invasion et la migration de cellules de carcinome colorectal, en activant la voie JAK2/STAT3 et l'expression de CXCL12/CXCR4 (*CXC Motif Chemokine Receptor 4*)²⁴³. Une surexpression de B7-H4 a également été associée à l'augmentation de la prolifération et des capacités d'adhésion, de migration et d'invasion de cellules de cancer ovarien²⁴⁴.

Il est intéressant de noter que la voie PI3K/AKT/STAT3 régule également la transition épithélio-mésenchymateuse, processus correspondant à la perte du phénotype épithélial

d'une cellule vers un phénotype mésenchymateux, suite à différents stimuli. Par exemple, dans le cas du carcinome hépatocellulaire, B7-H3 stimule les mécanismes de cicatrisation, de métastase et d'invasion des cellules en favorisant la transition épithélio-mésenchymateuse et en régulant l'axe JAK2/STAT3/SLUG (*Snail Family Transcriptional Repressor 2*)²⁴⁵. De même, la surexpression de SMAD1 après modulation de PI3K/AKT B7-H3-dépendante conduit à une diminution de l'expression de l'E-cadhérine et de la β -caténine, ainsi qu'une augmentation de la N-cadhérine et de la Vimentine dans des cellules de cancer colorectal²⁴⁶. La modulation du processus d'EMT serait déterminée par au moins un autre membre de la famille B7, PD-L1. Le groupe de Cao *et al.* a démontré, dans un modèle murin surexprimant PD-L1 à la surface des kératinocytes (KC), une augmentation de la survenue de tumeurs cutanées après stimulation avec le carcinogène methylcholantrene MCA²⁴⁷. Cet agent est connu pour induire la prolifération et la production de molécules pro-inflammatoires par les kératinocytes. Toutefois, lorsque PD-L1 est sur-exprimée, le MCA conduit à une production d'IL-10 plus importante par ces cellules, ainsi qu'à des modifications au niveau des cellules basales de l'épithélium, accompagnées d'une perte d'alignement et d'une condensation rapide de la chromatine. Cette régulation du processus d'EMT par PD-L1 s'accompagne d'une augmentation de l'expression des facteurs de transcription mésenchymateux SLUG et TWIST (*Twist Family BHLH Transcription Factor*) et d'une diminution du facteur épithélial E-cadhérine. Cet effet est indépendant de son récepteur PD-1²⁴⁷.

4.4.4. Métabolisme cellulaire

Certains membres de la famille B7, tels que B7-H3 et B7-H4, ont récemment été décrits comme régulateurs du métabolisme cellulaire, notamment de la glycolyse et des fonctions mitochondriales.

En 2016, Lim *et al.* ont mis en évidence que dans des cellules cancéreuses de sein et de mélanome, B7-H3 promeut la glycolyse aérobie, autrement appelée effet Warburg, en favorisant la consommation de glucose et la production de lactate *in vitro* et *in vivo*²⁴⁸. En effet, B7-H3 permet la stabilisation de la protéine HIF-1 α et de ses cibles directes, LDH-A (Lactate Déshydrogénase A) et PDK1, enzymes clés du métabolisme glycolytique. Cette stabilisation de HIF-1 α dépend du niveau intracellulaire de ROS. Aussi, B7-H3 réprime l'activité du facteur de transcription NRF2 (*Nuclear Factor Erythroid 2 (NF-E2)-related factor 2*), activé en condition de stress oxydatif, et de ses gènes cibles anti-oxydants *PRX3*, *SOD1* et *SOD2* (*Superoxyde dismutase 1/2*)²⁴⁸. Par ailleurs, afin de combattre la production de ROS, B7-H3 active la voie des Pentoses Phosphates (PPP), importante pour la régénération du NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), *scavenger* de ROS, à partir de

NADP⁺. B7-H3 aiderait ainsi les cellules glycolytiques à éliminer le stress oxydatif et à survivre ²⁴⁸. Une autre étude sur des cellules cancéreuses de sein triple négatives a confirmé l'augmentation de leurs capacités glycolytiques suite à la surexpression de B7-H3 ²³⁰.

D'autre part, cette protéine serait impliquée dans le métabolisme des lipides en régulant la β -oxydation mitochondriale. Ainsi, dans le cancer du poumon, B7-H3 module spécifiquement l'expression de la *fatty acid synthase* (FASN) ²⁴⁹. La délétion de B7-H3 réduit les niveaux d'expression d'ARNm et protéique de SREBP-1 (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1*), facteur de transcription régissant l'expression de FASN. B7-H3 favorise donc l'utilisation des acides gras par la mitochondrie.

De manière intéressante, un rôle dans la régulation des fonctions mitochondriales a été associé à la protéine B7-H4. Dans une lignée tumorale du cancer du col de l'utérus, son invalidation engendre une diminution du taux de consommation d'oxygène, de production d'ATP, du potentiel membranaire mitochondrial et de la masse mitochondriale. En revanche, cela accroît la production d'espèces réactives de l'oxygène ²⁵⁰. En particulier, l'activité du complexe de transport d'électrons III est fortement altérée dans ces cellules. Cela est notamment dû à une déplétion de protéines mitochondriales régulatrices majeures PGC1- α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) et mtTFA (*mitochondrial transcription factor A*), mais aussi des protéines UQCRC1 (*ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1*), sous-unité du complexe III, et BCL-xL, protéine anti-apoptotique. Ce dysfonctionnement mitochondrial augmente considérablement le stress oxydatif, à l'origine d'une activation importante de l'axe JNK (*c-JUN N-terminal kinase*)/p38/caspase après traitement à la doxorubicine et entraîne une élévation de la mort des cellules par apoptose. Ces altérations dans l'expression de PGC1- α , de la biogenèse mitochondriale en aval et de l'expression de gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative seraient dues à la suppression de la voie cAMP/PKA (Protéine kinase A)/CREB suite à l'invalidation de B7-H4 ²⁵⁰. B7-H4 possède donc un rôle dans la régulation de la fonction mitochondriale, étroitement liée à la physiologie des cellules cancéreuses et à leur chimiosensibilité.

Pour finir, de plus rares études ont mis en évidence un impact des autres membres B7, B7-H5 (VISTA), B7-H6 et B7-H7 dans la progression tumorale.

Concernant B7-H5, ses potentielles fonctions non-immunologiques sont très peu connues. Dans le cas du fibrosarcome, les cellules exprimant cette protéine ont une croissance tumorale plus importante que les cellules B7-H5-déficientes, *in vivo* dans des hôtes vaccinés ¹⁸¹. Il est donc nécessaire de déterminer les fonctions de B7-H5 sur la prolifération cellulaire, l'adhésion, l'apoptose, la migration et l'invasion. D'autre part, au sein du micro-environnement tumoral, B7-H7 promeut l'angiogénèse en interagissant avec son récepteur

CD28H (*CD28 Homolog*) exprimé à la surface des cellules endothéliales. Des thérapies ciblant cette protéine pourraient donc améliorer la réponse immune spécifique des tumeurs mais aussi inhiber l'angiogénèse tumorale ¹⁸¹. Enfin, l'expression de B7-H6 induit la prolifération, la formation de colonies, la migration et l'invasion de cellules de lymphome. L'inactivation de cette molécule favorise un arrêt en phase G0/G1 ainsi qu'une augmentation du taux d'apoptose et de la sensibilité à la vincristine et au dexaméthasone. Cet effet résulterait de l'abrogation de la voie STAT3 ²⁵¹. Il en est de même pour les lignées de gliome U87 et U251, dans lesquelles B7-H6 conduit à la prolifération, la migration, l'invasion et la survie des cellules. Toutefois, les mécanismes impliqués n'ont pas été mis en évidence dans la présente étude ²⁵².

Des études complémentaires seraient donc indispensables à la compréhension du réel impact de ces molécules B7 sur la progression tumorale.

4.5. Expression de PD-L1 dans le cancer du sein et ciblage de l'axe PD-1/PD-L1 en clinique

En conditions physiologiques, la sécrétion d'IFN- γ par les cellules favorise l'expression de molécules immuno-régulatrices telle que PD-L1, permettant la tolérance immune. En revanche, en conditions pathologiques, par exemple dans le cas de cancers, des molécules immuno-suppressives (IFN- γ , TGF- β , FASL) sont libérées dans le micro-environnement par les cellules malignes, engendrant l'expression de PD-L1 à leur surface et provoquant l'immuno-échappement de la tumeur ¹⁹⁴. Lors d'inflammation chronique, de faibles niveaux d'IFN- γ sont suffisants pour entraîner une sur-régulation de PD-L1 et ainsi favoriser le développement tumoral.

L'expression de cette protéine est associée aux facteurs clinico-pathologiques pour différents types de cancers solides (cancers du sein, rein, foie, œsophage, estomac, côlon, poumon, ovaire, pancréas, mélanome, tête et cou, glioblastome, cancer urothélial) mais aussi hématopoïétiques (leucémies, myélomes multiples, tumeurs thymiques) ^{157,176,253}. La majorité des études réalisées sur le sujet ont montré que l'expression de PD-L1 au sein du micro-environnement est corrélée à un mauvais pronostic avec une réduction du temps de survie et un haut grade tumoral ¹⁹³.

4.5.1. Expression de PD-L1 et cancer du sein

Le cancer du sein est la pathologie maligne la plus répandue chez les femmes dans le monde. Bien que la surveillance de la population, la détection précoce et le

développement de traitements spécifiques ont entraîné une baisse du taux de mortalité, le cancer du sein reste le plus meurtrier chez les femmes ²⁵⁴. Ainsi, il est plus important que jamais de se concentrer sur le développement de nouveaux traitements pour les patients atteints de ce cancer. La chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie sont des méthodes potentiellement curatives qui ont été utilisées pendant des décennies, avec succès dans certains cas. Cependant, ces méthodes ne parviennent pas à contrôler le cancer du sein métastatique avancé, ainsi que certains sous-types tumoraux agressifs. Heureusement, les progrès récents de la recherche fondamentale ont ouvert de nouvelles possibilités de ciblage des cancers en exploitant les mécanismes de défense du système immunitaire ²⁵⁴.

4.5.1.1. Classification des différents sous-types de cancer du sein

Divers types de carcinomes sont regroupés sous la terminologie « cancer du sein ». Aussi, ils sont organisés en différents sous-types, une classification qui est déterminante pour le traitement standard recommandé et pour le pronostic du patient. Depuis 2013, les cancers du sein sont caractérisés moléculairement et classés 4 sous-groupes distincts: Luminal A et B, HER2 positif et triple négatif ^{254,255}.

Le sous-type **luminal A** présente une expression des récepteurs aux œstrogènes (ER) et à la progestérone (PR) mais n'exprime pas le récepteur du facteur de croissance épidermique humain 2 (HER2). Ce sous-type est le plus commun et représente approximativement 40% des cancers du sein. Les tumeurs luminal A ont généralement un pronostic favorable avec un fort taux de réponse à l'hormonothérapie, par exemple au traitement par l'antagoniste du tamoxifène (Nolvadex®) ainsi qu'aux inhibiteurs de l'aromatase comme l'anastrozole (Arimidex®) ²⁵⁴.

Les tumeurs de type **luminal B** sont ER-positives mais PR-faibles ou –négatives, et peuvent être positives ou négatives à HER2. Ce sous-type, représentant environ 20% des cancers du sein, est plus agressif et ne répond pas aussi bien que les tumeurs lumineales A au traitement endocrinien, celui-ci étant dépendant de l'expression des récepteurs hormonaux ²⁵⁶. Pour cette raison, une thérapie cytotoxique supplémentaire (anti-HER2 ou chimiothérapie) est habituellement recommandée ²⁵⁵.

Les tumeurs **HER2⁺**, représentant 10 à 15% des cancers du sein, sont agressives et de mauvais pronostic. Elles peuvent être traitées avec l'anticorps monoclonal anti-HER2 trastuzumab (Herceptin®) ou pertuzumab (Perjeta®), en plus de la chimiothérapie (anthracyclines ou taxanes), ce qui améliore le taux de survie de 30% par rapport à la chimiothérapie seule ²⁵⁴.

Enfin, les tumeurs **triple négatives** (TNBC, *Triple Negative Breast Cancer*) représentent 15 à 20% des cancers du sein et n'expriment aucun des marqueurs ER, PR et HER2. Ces

cancers ne sont donc pas admissibles aux thérapies ciblées disponibles et doivent être traités par chimiothérapie ²⁵⁴. En conséquence, les cancers du sein TNBC sont particulièrement agressifs avec de forts taux de rechute et un mauvais pronostic. De plus, en fonction de leurs profils moléculaires très hétérogènes, les cancers TNBC peuvent être classés en différents sous-types : *basal-like*, *mesenchymal-like*, *luminal androgen receptor* (LAR) et immuno-enrichi ²⁵⁷. Ce dernier sous-type, caractérisé par la présence d'infiltrats immunitaires, a un meilleur pronostic par rapport aux autres et suggère ainsi un rôle pronostique voire prédictif du système immunitaire dans les cancers du sein triple négatifs ^{254,258}.

Aussi, le récent succès des inhibiteurs d'*immune checkpoints* dans les pathologies malignes solides et hématologiques, notamment ceux ciblant l'axe PD-1/PD-L1, encourage le développement de nouvelles stratégies immunothérapeutiques dans le cas du cancer du sein.

4.5.1.2. Expression de PD-L1 dans le cancer du sein

La première étude sur la prévalence de l'expression de cette protéine dans le cancer du sein remonte à 2006, lorsque Ghebeh *et al.* ont rapporté que 50% des cellules tumorales ou TILs issus d'échantillons primaires de cancer du sein, expriment PD-L1 ²⁵⁹. La présence de cette molécule s'associe positivement à la présence d'infiltrats immunitaires ²⁶⁰. De plus, une méta-analyse transcriptomique de 5454 lésions de cancer du sein a mis en évidence une fréquence très variable de l'expression de l'ARNm de PD-L1 : l'expression était plus importante dans les tumeurs TNBC et notamment les *basal-like*, suivie par les HER2⁺, puis par les sous-types luminaux A et B ²⁵³. Des niveaux élevés de PD-L1 ont été associés à des caractéristiques de pronostic telles qu'une taille tumorale importante, un stade avancé, l'absence des récepteurs ER, HER2 et du récepteur de la progestérone, ainsi qu'à un index prolifératif élevé ²⁵³. Il est à noter que la fréquence de PD-L1 est plus élevée dans les cancers du sein avec un phénotype inflammatoire ²⁵³. Par ailleurs, son expression dans les tumeurs solides est corrélée à une forte charge mutationnelle du gène suppresseur de tumeur *TP53* (*Tumor Protein P53*), alors qu'aucun lien entre l'expression de p53 et PD-L1 n'a été observé dans le cancer du sein ²⁵³. Récemment, PD-L1 a été détectée dans des cellules tumorales métastatiques circulantes dans le sang de patients atteints d'un cancer du sein HER2-négatif, positifs aux récepteurs hormonaux ²⁵³. A ce titre, l'évaluation de cette expression pourrait être utilisée, par biopsie liquide, pour la stratification et la surveillance de patients atteints de tumeurs et traités par des inhibiteurs de points de contrôle immuns. Dans les cancers du sein de type basal, la plupart des études ont rapporté une corrélation positive entre l'expression de PD-L1 et un pronostic favorable. Néanmoins, une corrélation inverse a été notée par certains chercheurs, entre l'expression de PD-L1 et le pronostic,

dans tous les sous-types à l'exception des luminaux A ²⁵³. L'impact clinique que peut avoir la protéine PD-L1 est donc controversé et des études complémentaires sont nécessaires afin d'appréhender la complexité de ce phénomène.

4.5.2. Ciblage de l'axe PD-1/PD-L1 en clinique

4.5.2.1. Développement d'*immune checkpoint inhibitors*

L'utilisation d'inhibiteurs de points de contrôle immunitaires (ou *immune checkpoint inhibitor*) comme agents anti-cancéreux est l'un des plus grands succès des thérapies contre le cancer de ces dernières années. A ce jour, ces inhibiteurs apparaissent comme un traitement de première ligne contre de multiples cancers, tels que le mélanome métastatique, le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC), le carcinome rénal et le cancer de la vessie ou de l'urothélium. Ils sont actuellement évalués dans de nombreux autres types de cancers solides et hématologiques avancés ²⁶¹. Ces nouvelles immunothérapies ont pour objectif premier de rétablir un micro-environnement empêchant la progression tumorale avec une réponse immunitaire anti-tumorale effective. De ce fait, les voies co-inhibitrices s'avèrent être des cibles clés. Actuellement, les deux classes d'immunothérapies approuvées par la FDA pour usage clinique sont les inhibiteurs du récepteur PD-1, de son ligand PD-L1 et de CTLA-4 ²⁶¹.

L'anticorps monoclonal anti-CTLA-4 (mAb) ipilimumab (Yervoy®) améliore la survie des patients atteints de mélanome métastatique lors des essais cliniques de phase III. Il a ensuite été approuvé par la FDA dans le cas de patients atteints de mélanome avancé ²⁶¹. L'anticorps monoclonal (mAb) anti-PD-1 humain BMS-936558 (nivolumab (Opdivo®)), étudié dans le cancer des cellules rénales (RCC), du mélanome, du carcinome pulmonaire non à petites cellules et du cancer colorectal, a démontré une activité anti-tumorale avant son approbation par la FDA pour plusieurs cancers ²⁶¹. Il en est de même pour l'anticorps humanisé anti-PD-1 MK-3945 (pembrolizumab (Keytruda®)) qui a montré une réponse anti-cancéreuse chez des patients atteints de certains cancers solides ²⁶¹. De plus, le pidilizumab (CT-011, MDV9300), un anticorps anti-PD-1 humanisé, testé dans diverses hémopathies malignes, montre un impact clinique potentiel chez les patients atteints de lymphome non hodgkinien, de leucémie lymphocytaire chronique, de lymphome de Hodgkin, de myélome multiple et de leucémie myéloïde. Enfin, les anticorps mAb anti-PD-L1 atezolizumab (Tecentriq®) et durvalumab (Imfinzi®) ont également été approuvés par la FDA pour leur activité anti-tumorale dans des cancers solides ²⁶¹.

Divers agents anti-cancéreux comprenant d'autres inhibiteurs de points de contrôles immunitaires, des inhibiteurs de kinase et des agents chimio-thérapeutiques sont utilisés en combinaison avec des anticorps mAb anti-PD-1 ²⁶¹.

4.5.2.2. Combinaison d'anticorps anti-PD-1 avec d'autres inhibiteurs d'immune checkpoint

L'utilisation en combinaison d'ipilimumab et de nivolumab a fait l'objet d'essais chez l'Homme pour le carcinome rénal métastatique à cellules claires (CCRCC), le mélanome avancé et le carcinome pulmonaire non à petites cellules ²⁶¹. Une étude de phase 1 (NCT01472081) dans le CCRCC a montré une innocuité et une tolérance prometteuses jusqu'à 100 jours après le dernier dosage. Les traitements combinés d'anti-PD-1 ou d'anti-PD-L1 avec d'autres inhibiteurs de point de contrôle sont en cours d'essais cliniques, tels que (i) une étude de phase I (NCT01968109) de nivolumab + BMS-936558 pour cibler PD-1/LAG-3 dans des tumeurs solides à un stade avancé; (ii) une étude de phase II (NCT02845323) associant le nivolumab et l'urelumab pour cibler PD-1/4-1BB dans le lymphome à cellules B; et (iii) une étude de phase II (NCT02543645) combinant l'atezolizumab et le varlilumab ciblant PD-L1/CD27 dans le RCC. Les données globales de l'immunothérapie combinée offrent de futurs traitements prometteurs contre le cancer ²⁶¹.

4.5.2.3. Combinaison d'anticorps anti-PD-1 et d'inhibiteurs de kinases

La protéine MAPK régule la molécule BRAF, responsable de la métastase du mélanome. La combinaison de l'immunothérapie anti-PD-1 avec un inhibiteur de BRAF entraîne une réponse anti-tumorale synergique et une suppression importante de la croissance tumorale ²⁶¹. D'autre part, le facteur de croissance VEGF peut inactiver les cellules dendritiques ; ainsi, la restauration de l'activité des cellules dendritiques et cellules T améliorerait la réponse immunitaire et l'activité anti-tumorale ²⁶¹. Une étude clinique de phase I (NCT01454102) d'inhibiteur du VEGF (bevacizumab (Avastin®)) associée au nivolumab est en cours pour les patients atteints d'un CPNPC de stade III et un mélanome non résécable de stade III/IV. Une autre étude de phase I/II (NCT02130466) utilisant des inhibiteurs de BRAF et de MEK en combinaison avec le pembrolizumab chez des patients atteints de mélanome et d'autres tumeurs solides ²⁶¹.

4.5.2.4. Combinaison d'anti-PD-1 et de chimio-thérapies

Les inhibiteurs de PD-1 sont testés en association avec des agents anti-néoplasiques comme le cis-platine afin d'obtenir un effet synergique anti-cancéreux durable. Par exemple, (i) une étude de phase III (NCT02494583) testant un traitement en combinaison du pembrolizumab avec le cis-platine ou de la capécitabine ou du 5-fluorouracile est en cours chez des patients atteints d'adéno-carcinome gastrique et (ii) une autre étude de phase I/II (NCT02077959) traitant les patients avec le pidilizumab (anticorps anti-PD-1) et le lénalidomide (Revlimid®) pour des myélomes multiples réfractaires.

PARTIE 2 : Métabolisme tumoral et régulation du stress oxydatif

1. Métabolisme des cellules tumorales

Les cellules tumorales subissent une reprogrammation de leur métabolisme énergétique, conséquence directe et indirecte de mutations oncogéniques, et caractéristique essentielle de la tumorigénèse. Cela leur permet d'acquérir assez de nutriments, même lorsque l'environnement est pauvre, et de les utiliser pour assurer leur prolifération et leur viabilité ^{55,262}.

En conditions physiologiques et présence d'oxygène, ou situation aérobie, les cellules normales différenciées métabolisent le glucose en pyruvate, incorporé dans les mitochondries et transformé par l'enzyme pyruvate déshydrogénase (PDH) en acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA) qui est ensuite intégré au cycle de Krebs, autrement appelé cycle TCA (ou cycle des acides tricarboxyliques) ou cycle de l'acide citrique. Suite à de multiples réactions enzymatiques, l'acétyl-CoA permet la production des cofacteurs donneurs d'électrons NADH (nicotinamide adénine dinucléotide réduit) et FADH₂ (dihydroflavine adénine dinucléotide), nécessaires au fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM). Ils initient la formation d'un gradient électrochimique par des réactions d'oxydo-réduction permettant le fonctionnement de la FoF1-ATP Synthase (complexe V) et la production d'ATP (adénosine triphosphate). On parle de phosphorylation oxydative (OxPHOS) (**Figure 8**). Lors de ces réactions, du dioxyde de carbone (CO₂) est également produit. A l'inverse, lorsque ces cellules normales sont soumises à une absence d'oxygène dans leur environnement, ou état d'anaérobie, leurs besoins en oxygène (O₂) sont plus importants. Elles se dirigent donc vers un métabolisme glycolytique, convertissant le pyruvate en lactate qui est ainsi peu utilisé par les mitochondries ²⁶².

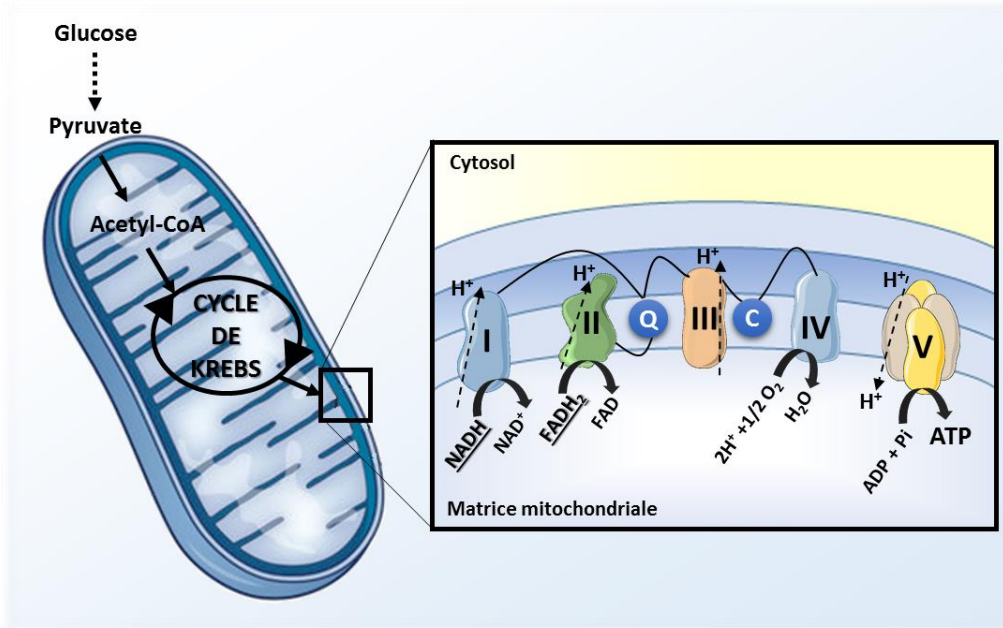


Figure 8 : Phosphorylation oxydative et production d'ATP.

En conditions physiologiques, le glucose est transformé en pyruvate par la voie de la glycolyse. Celui-ci va ensuite être transformé par la pyruvate déshydrogénase (PDH) en acétyl-CoA, métabolite capable d'entrer dans le cycle de Krebs et ainsi permettre la génération de NADH et FADH₂, cofacteurs énergétiques ensuite utilisés par le complexe I (NADH-ubiquinone oxydoreductase) ou II (succinate-ubiquinone oxydoreductase) de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM), respectivement. Ces cofacteurs vont ensuite être réoxydés à travers un flux d'électrons au niveau des complexes III (ubiquinol-cytochrome C oxydoreductase) et IV (cytochrome C oxydase). Cela génère un gradient de protons H⁺ ensuite utilisé par le complexe V (FoF1-ATP synthase) pour la production d'ATP.

Les cellules cancéreuses ont un métabolisme cellulaire particulier les différenciant de leurs homologues normaux. En 1927, Otto WARBURG montra que des cellules tumorales issues de liquide d'ascite transforment le glucose en lactate par la voie glycolytique, même en présence d'oxygène ²⁶³. On parle de glycolyse aérobie. Ce *switch* métabolique entre phosphorylation oxydative et glycolyse, appelé « Effet Warburg », est retrouvé dans un grand nombre de cancers et est corrélé à un mauvais pronostic (**Figure 9**) ²⁶⁴. Cette consommation accrue de glucose par les cellules malignes a rendu possible le développement de la tomographie par émission de positon. Cet outil de diagnostic, détection des tumeurs et de suivi clinique, se base sur l'utilisation d'un analogue de glucose radiomarqué, le 2-FDG (*2-deoxy-2-fluoro-D-glucose*), fortement incorporé dans les tumeurs et les rendant détectables ²⁶⁵.

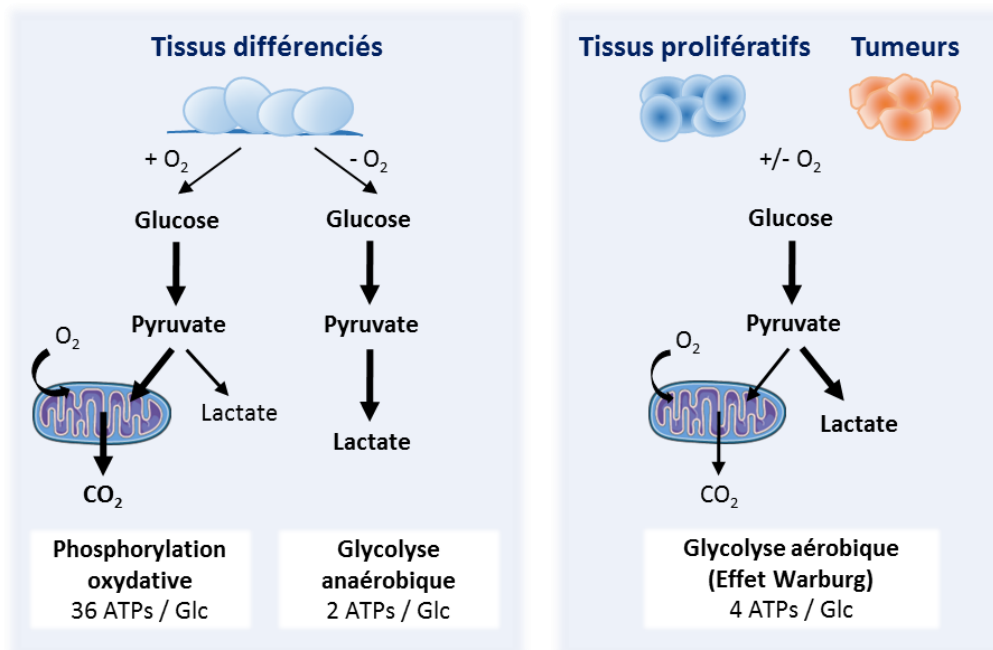


Figure 9: Reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses.

En présence d'oxygène, les cellules de tissus différenciés métabolisent le glucose en pyruvate, lui-même utilisé par les mitochondries pour générer de l'ATP au travers le cycle de Krebs ; on parle de phosphorylation oxydative (36 molécules d'ATP générées pour 1 molécule de glucose). En condition d'hypoxie, ces cellules métabolisent le glucose en pyruvate puis en lactate ; on parle de glycolyse anaérobie (2 molécules d'ATP pour 1 de glucose). A l'inverse des tissus sains différenciés, les tissus prolifératifs et les tumeurs ont un métabolisme particulier en favorisant la production de lactate par la voie de la glycolyse, à la voie de la phosphorylation oxydative, quelque soit les niveaux d'oxygène dans l'environnement. On parle de glycolyse aérobie ou effet Warburg, générant 4 molécules d'ATP pour 1 de glucose. Le schéma est inspiré de Cairns RA et al²⁶⁴.

1.1. « Effet Warburg » et production de macromolécules

1.1.1. Dérégulation de la consommation de glucose et des voies alternatives

Ce *switch* entre OxPHOS et glycolyse par les cellules tumorales, ou reprogrammation métabolique, est contre-intuitive car la voie glycolytique génère seulement deux molécules d'ATP, soit dix-huit fois moins que l'OxPHOS qui en produit trente-six. Les cellules compensent donc cette perte de rendement par une captation accrue de glucose, en partie due à une surexpression des transporteurs de glucose en surface⁵⁵. Otto WARBURG a émis l'hypothèse que ce *switch* métabolique est une conséquence directe d'un dysfonctionnement mitochondrial. Les mitochondries seraient incapables de fournir de l'énergie sous forme d'ATP et la voie glycolytique serait alors nécessaire pour la survie des cellules²⁶⁶. Cette théorie est en réalité erronée pour la majorité des cancers. En effet, les cellules tumorales et notamment celles issues de liquide d'ascite ont une respiration mitochondriale fonctionnelle²⁶⁴. Un défaut de tumorigenèse peut être provoqué suite à une déplétion d'ADN mitochondrial dans des lignées de cancer du sein et du cerveau²⁶². En outre, les mutations

de gènes codant des protéines clés du métabolisme mitochondrial sont des événements rares, sauf dans des cas de leucémies et glioblastome ²⁶⁷. Ces données démontrent l'importance des mitochondries dans le développement tumoral et suggèrent une explication alternative pour comprendre la glycolyse aérobie. De plus, contrairement aux cellules normales, les cellules cancéreuses ne profitent pas du couplage glycolyse / cycle de Krebs et préfèrent convertir le surplus de pyruvate en lactate plutôt que de l'utiliser par phosphorylation oxydative ²⁶⁴. Cela s'explique car la reprogrammation métabolique permet le maintien de l'équilibre d'oxydo-réduction (redox) essentiel à la survie, une production rapide d'ATP notamment en condition hypoxique, mais aussi une diversification des intermédiaires glycolytiques et la biosynthèse de molécules ayant un rôle de précurseur pour la division cellulaire. En effet, le phénotype Warburg est un état métabolique orienté vers la synthèse de macromolécules ^{262,265,268}. Lors de la division cellulaire, la cellule a besoin de dupliquer ses éléments (acides nucléiques, protéines et lipides) ; la quantité importante de précurseurs requise pour la synthèse de ces macromolécules est donc à l'origine de la dérégulation de l'import en nutriments, notamment du glucose et de la glutamine ²⁶². Leur catabolisme permet à la cellule de capturer des agents réducteurs, tels que le NADH et FADH₂ essentiels à la formation d'ATP par l'OxPHOS ou du NADPH maintenant ainsi l'état redox cellulaire ²⁶⁹.

1.1.1.1. Catabolisme du glucose ou glycolyse

La glycolyse est une voie métabolique permettant de maintenir diverses réserves d'intermédiaires carbonnés et agents réducteurs utilisés pour la formation de macromolécules. Plusieurs voies alternatives y sont associées (**Figure 10**) ²⁶².

Parmi elles, se trouve la voie des pentoses phosphates, transformant le Glucose-6-Phosphate (G-6-P), Fructose-6-Phosphate (F-6-P) et le Glyceraldehyde-3-Phosphate (G-3-P) en Ribose-5-Phosphate (R-5-P), précurseur des nucléotides. Elle permet également la génération de NADPH. Une seconde voie, celle de la biosynthèse de la Sérine/Glycine conduit à la production d'acides aminés à partir du 3-Phosphoglycérate (3-PG), tandis que la voie de biosynthèse des hexosamines impliquant le Fructose-6-Phosphate (F-6-P) fournit des substrats pour les N- et O-glycosylations. La glycolyse permet également la formation de divers phospholipides (ou acides gras) à partir du G-3-P. Enfin, la glycogénolyse permet le maintien du glycogène comme source intracellulaire de G-6-P. La transformation du pyruvate en lactate préserve une quantité suffisante de NAD⁺ (Nicotinamide adénine dinucléotide) nécessaire pour les premières réactions enzymatiques de la glycolyse ainsi que pour le cycle de Krebs ^{262,264,267,269}.

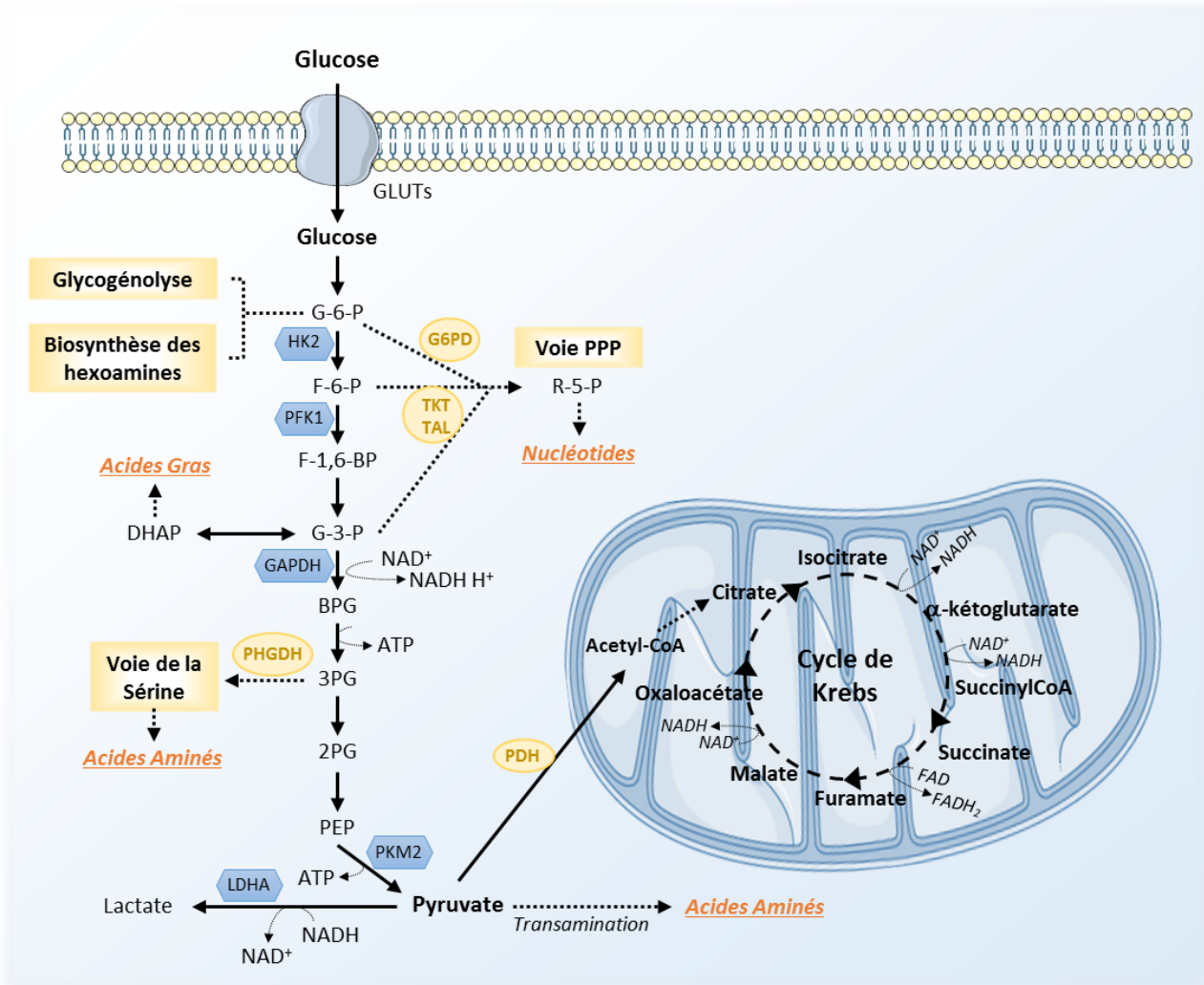


Figure 10: Métabolisme du glucose et synthèse de macromolécules.

Une captation de glucose accentuée (par les transporteurs de glucose, GLUTs) ainsi qu'une augmentation de la glycolyse sont observées dans le cas des cellules cancéreuses. Le glucose est transformé en Glucose-6-phosphate puis en divers intermédiaires de la glycolyse suite à une dérégulation des enzymes de la voie glycolytique. Ces intermédiaires sont ensuite dirigés vers la voie des pentoses phosphates (PPP) pour la synthèse de nucléotides, la voie de la glycogénolyse, la voie de biosynthèse des hexoamines ou la voie de la sérine permettant la production d'acides aminés. Des acides gras sont également générés à partir de la voie du DHAP (Dihydroxyacétone phosphate). Les acides aminés peuvent être produits par réaction de transamination du pyruvate. Inspiré de ²⁶⁹.

1.1.1.2. Catabolisme de la glutamine

La forte demande en glutamine des cellules prolifératives a été décrite pour la première fois dans les années 1950 par Harry EAGLE ²⁶². Un des rôles physiologiques de la glutamine est de faciliter le métabolisme du nitrogène (ou azote, N), alors réduit pour permettre la synthèse *de novo* des nucléotides purines et pyrimidines, de la glucosamine-6-P ainsi que d'acides aminés non essentiels. Les acides aminés essentiels (leucine, isoleucine, valine, méthionine, tyrosine, tryptophane et phénylalanine) proviennent de sources externes et la glutamine aide à leur acquisition ²⁶².

Ainsi, cela explique les différences métaboliques entre cellules normales et cancéreuses. Si les cellules quiescentes ou non prolifératives – cellules souches cancéreuses et cellules circulantes dans les cancers – se dirigent vers la voie du cycle de Krebs pour maintenir l'homéostasie cellulaire, les cellules prolifératives et tumorales procèdent différemment. Ces dernières augmentent leur captation en nutriments afin de subvenir aux besoins liés à la division cellulaire et favorisent la glycolyse, voie de biosynthèse de diverses biomolécules (acides gras, dérivés pentoses et hexoses, glycérol, nucléotides, acides aminés non essentiels) et intermédiaires carbonnés²⁶². Par ailleurs, les cellules malignes présentent un découplage du flux glycolytique mitochondrial en faveur du phénotype Warburg. Dans ces cellules, seul un faible taux de pyruvate dérivé du glucose est effectivement oxydé dans les mitochondries, la majorité de ce substrat étant transformé en lactate (**Figure 10**). Les difficultés du pyruvate à pénétrer dans les mitochondries et y être transformé en acétyl-CoA engendrent un découplage du flux glycolytique mitochondrial. Plusieurs causes sont possibles : par exemple, un défaut d'activation de la pyruvate déshydrogénase, enzyme catalysant la transformation du pyruvate en acétyl-CoA, ou une sous-expression de la protéine MPC (*Mitochondrial pyruvate carrier*) responsable du transport du pyruvate dans la mitochondrie²⁶².

1.1.2. Les réactions anapérotiques mitochondriales

Contrairement à l'hypothèse émise par Otto WARBURG, les mitochondries des cellules tumorales sont essentielles à la tumorigenèse et permettent la prolifération et la survie de ces cellules ; elles ne sont donc pas inactives ou défailtantes. En effet, outre leur rôle énergétique dans la synthèse d'ATP, elles favorisent l'utilisation de substrats carbonés autres que le glucose et nécessaires à la biosynthèse de macromolécules, à la prolifération et à la survie²⁶². Ces fonctions vitales sont notamment dues aux réactions anapérotiques mitochondriales, réactions chimiques produisant des métabolites et induites par l'utilisation de la glutamine ou par la pyruvate carboxylase.

La captation augmentée de la glutamine par les cellules tumorales et son utilisation favorisent le bon fonctionnement du cycle de Krebs ainsi que les réactions anapérotiques (**Figure 11**), même dans le cas de lignées cellulaires fortement glycolytiques comme celles de glioblastome²⁷⁰. Selon le type de réaction enzymatique que la glutamine subit, elle est source de nitrogène ou de carbone. Suite à sa captation, la glutamine est déaminée par l'enzyme GLS (glutaminase) pour donner du glutamate, ensuite pris en charge dans la mitochondrie par la GDH (glutamate déshydrogénase) et transformé en α -kétoglutarate (α -

KG). Ce dernier est un métabolite du cycle de Krebs et possède deux avenir : la glutaminolyse ou la carboxylation réductive.

La glutaminolyse correspond à l'utilisation de l' α -KG par le cycle de Krebs pour former du malate, lui-même transformé par l'enzyme malique (EM) en pyruvate et lactate dans le cytosol. Dans certains cas, le pyruvate produit peut entrer dans la mitochondrie, être transformé en acétyl-CoA et permettre le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale ²⁷⁰. D'autre part, le mécanisme de carboxylation réductive, autrement appelé cycle de Krebs inverse, utilise l' α -KG pour synthétiser de l'isocitrate puis du citrate après action de l'enzyme isocitrate déshydrogénase 2 (IDH2). Le citrate est transporté dans le cytosol et utilisé comme source de synthèse des acides gras par l'ATP-citrate liase (ACL) qui le transforme en acétyl-CoA. Il peut également être transformé en oxaloacétate (OAA) pour induire la synthèse d'acides aminés (aspartate et alanine) ou d'acides nucléiques, nécessaires à la prolifération et la survie des cellules cancéreuses ²⁶⁷.

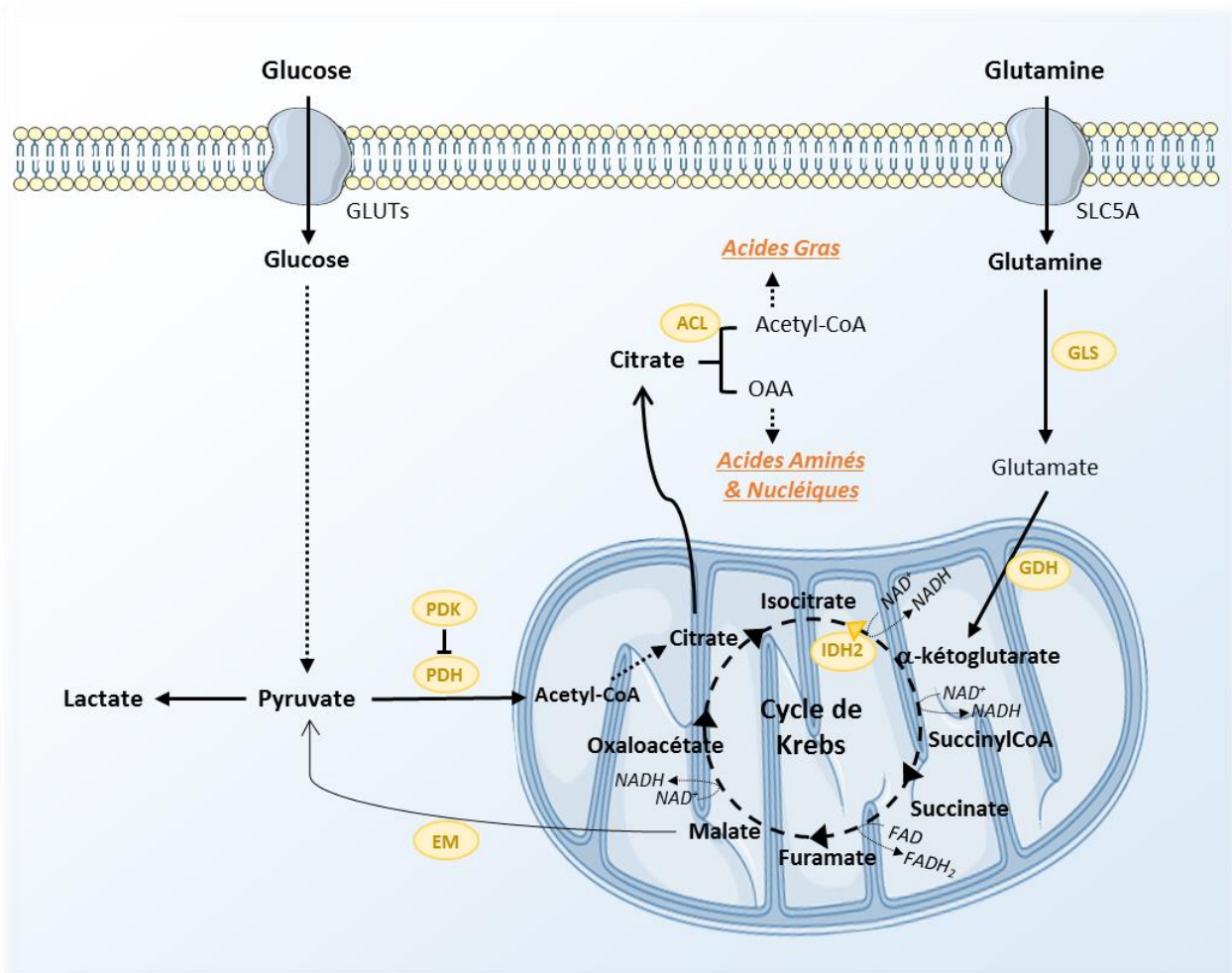


Figure 11: Métabolisme de la glutamine dans les cellules cancéreuses.

Les cellules tumorales présentent une élévation du métabolisme de la glutamine, caractérisé par une surexpression du transporteur SLC5A ainsi que des enzymes participant à la transformation de ce substrat. L' α -cétoglutarate provenant du métabolisme de la glutamine

est utilisé au niveau du cycle de Krebs pour être transformé en malate ou en citrate. Le malate peut aller dans le cytosol pour permettre la synthèse de pyruvate grâce à l'enzyme malique (EM). Le citrate est quant à lui utilisé pour la production d'acides gras, d'acides aminés et d'acides nucléiques.

L'anaplérose mitochondriale est induite par l'hypoxie. En outre, en absence d'oxygène, l' α -KG dérivé de la glutamine est un substrat majeur des fonctions mitochondriales. Par exemple pour des lignées cellulaires de différents types de cancers, la survie des cellules résulte de l'utilisation de la glutamine par la mitochondrie, régulée par le facteur HIF-1 α . En normoxie, la glutamine est substrat du cycle de Krebs, alors qu'en condition hypoxique elle est utilisée par le processus de carboxylation réductive pour produire du citrate et synthétiser des acides gras ²⁷¹. De plus, ces réactions mitochondriales sont essentielles pour la tumorigénèse, ce qui explique que la captation de glutamine par les cellules malignes soit fortement supérieure à celle des cellules normales. Il a par exemple été montré que l'inactivation génique de la glutaminase GLS engendre une diminution de la prolifération, de la survie et de la migration des cellules cancéreuses, associée à une dérégulation des fonctions respiratoires par la CRM, de la production d'ATP et de la biosynthèse d'acides aminés ^{272,273}. La biosynthèse de lipides engendrée par la carboxylation réductive est nécessaire à la survie et croissance de cellules de carcinome rénal issues de patients et possédant des défaillances au niveau des complexes mitochondriaux I et III ²⁷⁴. Par ailleurs, même si la plupart des cellules tumorales ont une glycolyse exacerbée, il existe une grande hétérogénéité et flexibilité au niveau de leur phénotype métabolique ; ainsi, on dénote une hétérogénéité d'utilisation de la glutamine par ces cellules. Lors du développement tumoral, la quantité de nutriments disponibles dans le milieu extracellulaire varie selon la région; les cellules malignes doivent donc s'adapter métaboliquement. A ce titre, l'équipe de Deberardinis a mis en évidence que l'utilisation de la glutamine est modulée selon les besoins cellulaires et le type de cancer : selon le contexte, les cellules préféreront la voie de la glutaminolyse ou celle de la carboxylation réductive ²⁷⁰. Par exemple, si des cellules de mélanome transforment principalement la glutamine en citrate afin de synthétiser des lipides, les cellules de glioblastome produisent majoritairement du lactate à partir de la glutamine par la voie de la glutaminolyse. Dans ce dernier cas, la synthèse de lipides est assurée par le glucose ²⁷⁰. Des études plus approfondies sont nécessaires afin de déterminer l'importance que peut avoir le contexte cellulaire (nutriments disponibles, quantité d'oxygène) dans le choix des voies métaboliques par les cellules malignes.

La glutamine est donc un précurseur privilégié des réactions anaplérotiques. Toutefois, lorsque l'apport en glutamine est restreint, les cellules tumorales compensent en utilisant la pyruvate carboxylase (PC) dont l'activité permet de subvenir à leurs besoins.

Cette enzyme catalyse la transformation du pyruvate en oxaloacétate (OAA), réapprovisionnant le cycle de Krebs pour favoriser la synthèse de précurseurs des acides aminés, des acides nucléiques et des acides gras. La pyruvate carboxylase est surexprimée dans de nombreux cancers. En cas de déficiences enzymatiques dans le cycle de Krebs, le pyruvate extracellulaire est métabolisé par la PC en aspartate, précurseur des acides nucléiques et acides aminés (asparagine). Il permet donc la survie et la prolifération des cellules cancéreuses ^{275,276}.

1.1.3. Acides gras et β -Oxydation mitochondriale

Une autre caractéristique métabolique des cellules tumorales est la biosynthèse *de novo* des acides-gras. Si elle est faible dans les tissus adultes normaux exceptés les tissus lipogéniques (foie, tissu adipeux, épithélium mammaire en période de lactation), cette biosynthèse se trouve fortement augmentée lors de la tumorigénèse ²⁶². Les trois composants majeurs de la voie de biosynthèse des acides gras, ACLY (*ATP citrate lyase*), ACC (*acétyl-CoA carboxylase*) et FASN, sont fréquemment surexprimés dans les cellules transformées. Leur inhibition par utilisation de siRNA réduit la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* ²⁶².

Les lipides synthétisés sont utilisés de différentes manières. Ils permettent la formation de bi-couches lipidiques ; de ce fait, les cellules malignes ont une composition membranaire altérée, riche en acides gras saturés moins sensibles à un stress oxydatif ²⁷⁷. Ces acides gras participent également au cycle de Krebs et au fonctionnement de la CRM et permettent ainsi la production d'énergie. Cela passe par le processus de β -oxydation, voie de dégradation principale des acides gras (**Figure 12**). Au niveau métabolique, les acides-gras pénètrent dans les cellules, sont transformés par la FAS (*fatty acid synthase*) en acyl-CoA qui entre dans la mitochondrie grâce à une navette carnitine, pour subir la β -oxydation. Cette voie permet la formation d'acétyl-CoA utilisé dans le cycle de Krebs, mais aussi la production des cofacteurs NADH et FADH₂ qui alimentent la CRM.

Les cellules tumorales surexpriment les enzymes de la β -oxydation, par exemple l'énoyl-CoA hydratase ²⁷⁸ et le transporteur CPT1 ²⁷⁹. L'amplification de cette voie induit une production accrue d'acétyl-CoA utilisable par le cycle de Krebs et donc la production d'ATP, influençant la prolifération et la migration des cellules cancéreuses ²⁶².

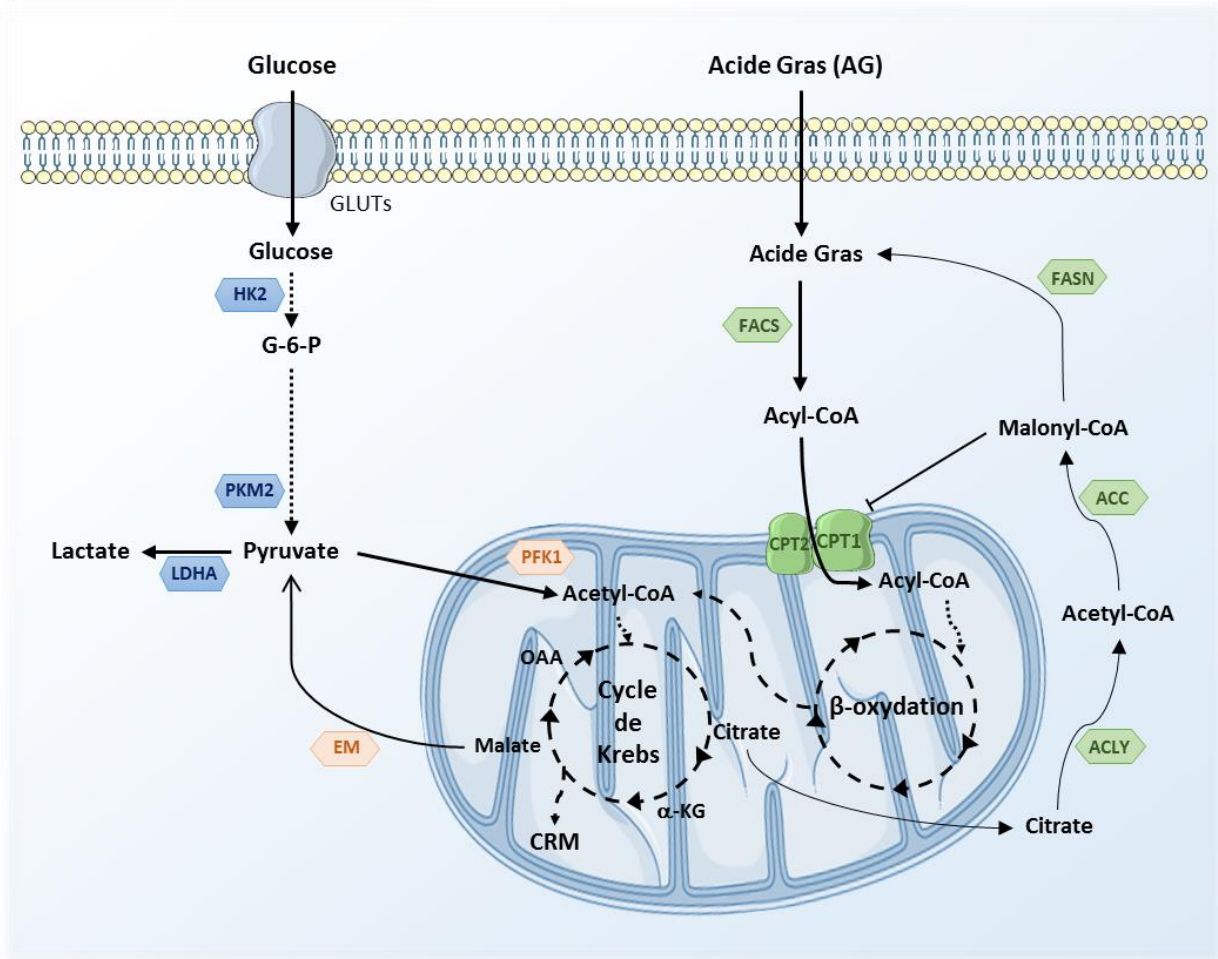


Figure 12: Cellules cancéreuses, acides-gras et β -oxydation.

Les acides gras pénètrent dans les cellules et sont transformés en acyl-CoA par la Fatty Acid Synthase (FAS). L'acyl-CoA entre ensuite dans la mitochondrie à l'aide d'une navette carnitine pour être substrat du processus de β -oxydation. Cette dégradation des acides gras aboutie à la formation d'acétyl-CoA utilisé dans le cycle de Krebs, mais aussi à la production des cofacteurs $NADH$ et $FADH_2$ nécessaires au fonctionnement de la CRM.

1.2. Régulation du métabolisme cellulaire

Les modifications métaboliques des cellules cancéreuses sont influencées par des stimuli internes comme des altérations génétiques au niveau de protéines clés, mais aussi par l'environnement cellulaire. Ces stimuli modulent le destin cellulaire en impactant la survie, la croissance, la migration, la différenciation et la prolifération des cellules malignes

280

1.2.1. Altérations métaboliques et micro-environnement

L'environnement tumoral est caractérisé par une fluctuation du niveau d'oxygène et un apport variable en nutriments selon la région tumorigène, influençant le métabolisme

cellulaire alors hétérogène au sein d'une tumeur. Un défaut d'angiogénèse est souvent à l'origine d'une telle fluctuation en O₂ ²⁶².

1.2.1.1. Modulation métabolique des cellules stromales

Le statut métabolique d'une cellule affecte ses fonctions ainsi que le phénotype des autres cellules de son micro-environnement. Différents types cellulaires génétiquement stables sont connus pour subir des changements phénotypiques en raison de leur résidence au voisinage d'une tumeur croissante. Parmi ces cellules, on retrouve les fibroblastes associés aux tumeurs, les cellules endothéliales et les cellules du système immunitaire inné et adaptatif ²⁸¹.

Cette reprogrammation micro-environnementale, essentielle à la croissance et à la dissémination de la tumeur, est permise par les cellules cancéreuses après la mise en place de multiples stratégies (**Figure 13**) ²⁶² : la sécrétion de facteurs de croissance, mais aussi les altérations de la matrice extracellulaire (MEC), des interactions cellule-cellule et de la composition métabolique du milieu. D'autre part, des fortes consommations en glucose et glutamine par les cellules tumorales conduisent à l'accumulation de lactate extracellulaire. Cela affecte un grand nombre de types cellulaires et promeut l'angiogénèse, l'invasion tumorale ainsi que l'émergence d'un micro-environnement immuno-permissif. La promotion de l'angiogénèse par le lactate est due à la sécrétion du facteur pro-angiogénique VEGF par les macrophages et à la stabilisation du facteur de transcription HIF-1 α par les cellules endothéliales ^{2,269,22,23}. De plus, la sécrétion de lactate dans le milieu extracellulaire par le transporteur MCT1 (*Monocarboxylate transporter 1*) est couplée au co-transport d'ions H⁺ et cause l'acidification du milieu. Cette acidité provoque l'activité protéolytique des enzymes métalloprotéases matricielles MMPs et des cathepsines, engendrant la dégradation des composants de la MEC, ce qui facilite l'invasion tumorale ^{284,285}. Celle-ci est également favorisée après la production d'acide hyaluronique par les fibroblastes, en réponse aux taux importants de lactate par les cellules malignes ²⁸⁶. Enfin, l'environnement immuno-permissif engendré par le lactate extracellulaire est dû à l'atténuation de l'activation des cellules dendritiques et lymphocytes T, ainsi qu'à la migration des monocytes ²⁸⁷⁻²⁸⁹. A l'inverse, il stimule la polarisation des macrophages résidents en un phénotype M2 immuno-suppresseur ²⁹⁰.

Aussi, l'immuno-échappement est permis après captation de tryptophane par les cellules tumorales, ensuite transformé en kynurénine par les enzymesIDO et Tryptophane-2,3-dioxygénase (TDO2) ^{99,100}. Une déplétion du milieu extracellulaire en cet acide aminé essentiel déclenche l'apoptose des cellules T effectrices, alors que la kynurénine sécrétée

par les cellules cancéreuses promeut le phénotype T régulateur. La kynurénine aurait également un rôle dans la dégradation de la matrice extracellulaire et l'invasion ^{99,100}.

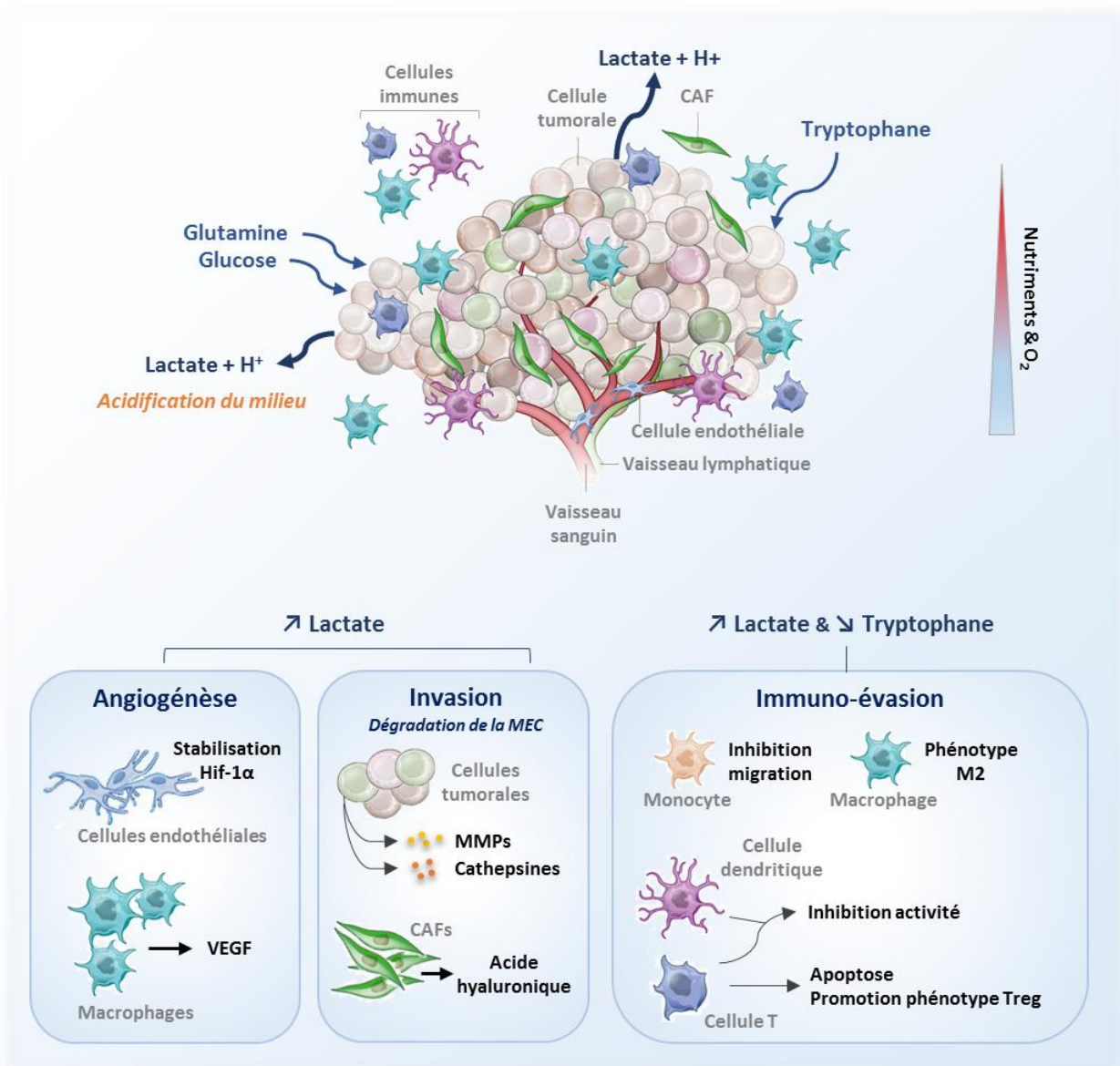


Figure 13: Modulation métabolique des cellules stromales par le micro-environnement tumoral.

De fortes consommations en glucose, glutamine et tryptophane par cellules tumorales engendrent une accumulation de lactate extracellulaire. Cela promeut 1) l'angiogénèse par la sécrétion du facteur VEGF par les macrophages et la stabilisation de HIF-1 α par cellules endothéliales ; 2) l'invasion tumorale suite à l'activation des enzymes métalloprotéases matricielles (MMPs), des cathepsines et la production d'acide hyaluronique ; 3) un micro-environnement immuno-permissif en atténuant l'activité des cellules dendritiques et des lymphocytes T, la migration des monocytes ainsi qu'en stimulant la polarisation des macrophages en un phénotype M2. De même, une déplétion du milieu en tryptophane provoque l'apoptose des CTL.

1.2.1.2. Modulation métabolique des cellules cancéreuses

En plus d'affecter la fonctionnalité des cellules stromales, les conditions du micro-environnement tumoral influent fortement sur le métabolisme des cellules malignes. Celles-ci étant souvent confrontées à des environnements pauvres en nutriments et oxygène, elles développent diverses stratégies afin de contourner ces limites (**Figure 14**)²⁶².

A ce titre, des substrats carbonés et des voies métaboliques adaptatives sont utilisés par ces cellules. Effectivement, la captation de glucose par les cellules tumorales est augmentée par rapport à leurs homologues normaux. Ce glucose est métabolisé en pyruvate par la voie de la glycolyse et transformé en lactate. Cependant, ces cellules peuvent utiliser des sources d'énergie additionnelles ou alternatives en métabolisant par la voie mitochondriale d'autres substrats, tels que les acides gras ou la glutamine, comme cela a été décrit respectivement dans les cas de leucémies et de cancers du sein²⁶⁷. Ainsi, selon les déprivations du micro-environnement tumoral, les cellules adaptent leur métabolisme en consommant d'autres substrats ; on parle de flexibilité du métabolisme énergétique, essentiel à la survie de ces cellules. Par exemple, des cellules cancéreuses HeLa privées de glucose s'adaptent en consommant préférentiellement de la glutamine²⁹¹. De même, l'invalidation génique de la glutaminase pour des cellules de gliome glutamine-dépendantes engendre l'utilisation du glucose, transformé en pyruvate puis en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase²⁹². Dans le cas de cellules de mélanome, une privation en glucose provoque la consommation d'acétate, nécessaire à leur croissance. L'acétate est un substrat carboné, transformé par les acétyl-CoA-synthétases (ASCC) mitochondriale (ASCC1) et cytoplasmique/nucléaire (ASCC2) en acétyl-CoA, ensuite utilisé par les mitochondries²⁹³. Le lactate, produit de dégradation issu de la glycolyse et présent dans le micro-environnement, peut être utilisé par les cellules tumorales afin de produire du pyruvate et permettre la phosphorylation oxydative²⁹⁴.

Par ailleurs, l'environnement tumoral est souvent caractérisé comme étant hypoxique ; l'instabilité et la désorganisation de la néovasculature tumorale sont à l'origine d'un niveau d'oxygénation variable au sein d'une tumeur, avec des fluctuations régionales et temporelles⁵⁵. Ces zones d'oxygénation distinctes présentent des statuts métaboliques ainsi que des phénotypes cellulaires différents. En effet, la présence de cellules cancéreuses avec un phénotype invasif et migratoire suite à la promotion du processus EMT, caractérise les régions hypoxiques^{55,262,269}. En entravant la phosphorylation oxydative et d'autres réactions métaboliques nécessitant de l'oxygène, l'hypoxie perturbe l'équilibre d'oxydo-réduction et affecte la signalisation cellulaire et les programmes transcriptionnels²⁶². Le facteur de transcription HIF-1 α , stabilisé dans les cellules retrouvées au niveau de régions hypoxiques,

favorise un métabolisme glycolytique en augmentant l'expression des transporteurs de glucose et enzymes métaboliques. Les zones oxygénées sont quant-à-elles caractérisées par un métabolisme mitochondrial ⁵⁵. Il est intéressant de noter qu'en conditions hypoxiques, les lipides sériques sont essentiels à la survie des cellules tumorales en empêchant leur apoptose due à un stress réticulaire ²⁹⁵. Les cellules hypoxiques peuvent également importer des acides gras insaturés du micro-environnement, sous forme de lysophospholipides à chaîne unique acylée, pour supplémer la privation de certains acides gras ²⁹⁶.

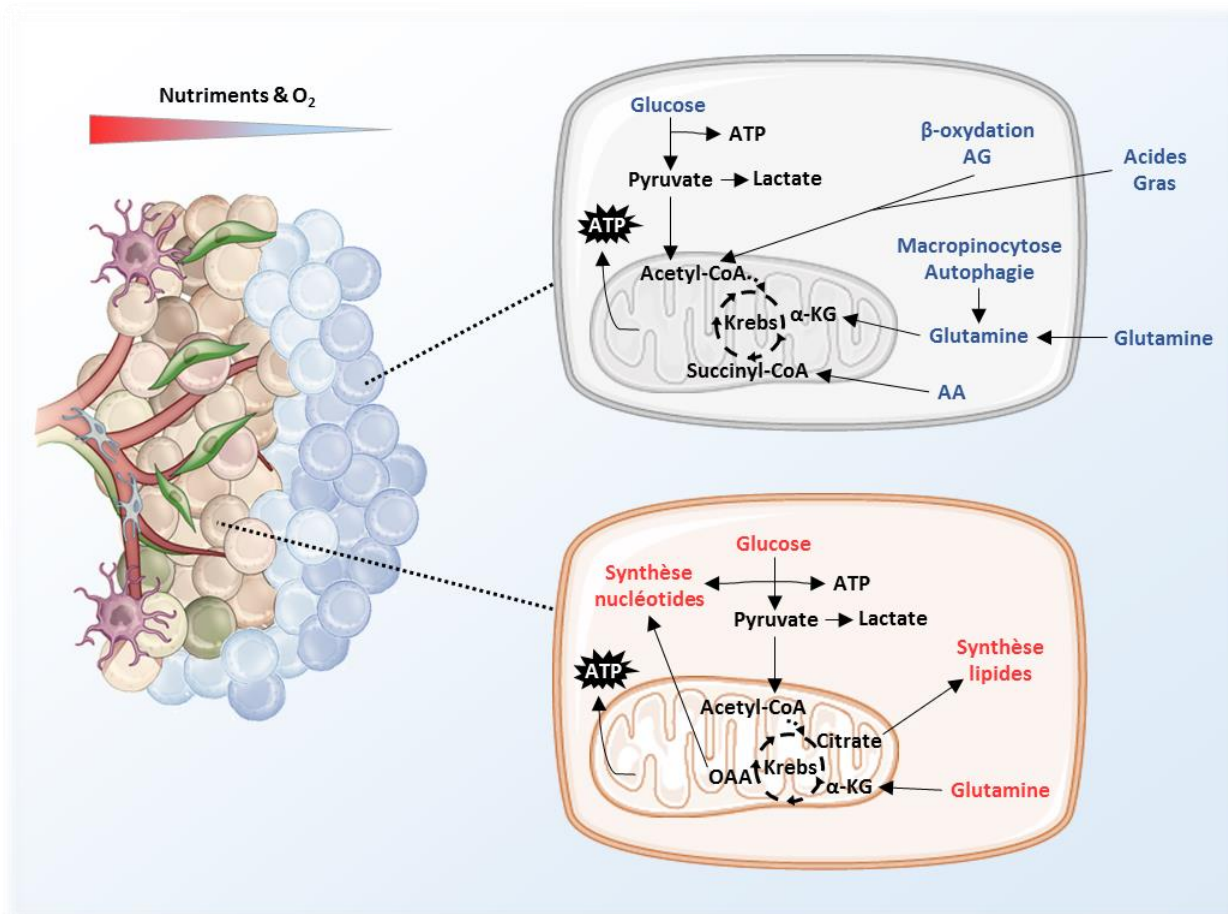


Figure 14: Voies métaboliques des cellules cancéreuses selon les conditions environnementales.

La proximité du système vasculaire régule l'accessibilité des cellules malignes aux nutriments. Les cellules se situant à proximité utilisent ces nutriments et l'oxygène pour alimenter les voies anaboliques favorisant la prolifération tumorale. A l'inverse, les cellules plus éloignées des vaisseaux ont une accessibilité aux nutriments réduite et s'engagent ainsi dans des voies alternatives métaboliques telles que la β -oxydation des acides gras, l'oxydation des acides aminés branchés (BCAA), ainsi que la dégradation macromoléculaire par autophagie et macropinocytose pour soutenir la viabilité cellulaire (inspiré de Debaradinis et al., 2016 ²⁹⁷).

D'autre part, l'hétérogénéité métabolique au sein d'une tumeur contribue à son développement en favorisant la coopération des cellules malignes avec les cellules

environnantes, cancéreuses ou stromales. On parle de symbiose cellulaire. Les cellules cancéreuses des régions oxygénées captent le lactate relargué par les cellules transformées glycolytiques environnantes et le transforment en pyruvate, métabolite utilisé pour la production d'ATP par le mécanisme de phosphorylation oxydative mitochondriale ²⁹⁴.

Les cellules du stroma tumoral fournissent également des substrats carbonés aux cellules cancéreuses ²⁹⁸. Dans certains contextes, les cellules transformées sécrètent de l'IL-6 et du TGF- β dans le milieu, ce qui conduit à la transformation des fibroblastes en CAFs glycolytiques, fournissant du lactate aux cellules tumorales proches des vaisseaux sanguins. Cet effet est permis grâce à une expression différentielle des transporteurs de lactate ^{294,298}. Ce métabolite est excrété par les fibroblastes par le transporteur MCT4, puis capté par les cellules cancéreuses à l'aide de MCT1 ²⁹⁸. Le lactate est donc considéré comme un substrat énergétique à part entière et non pas uniquement comme un déchet. On parle de « *Reverse Warburg Effect* ». En 2015, Tardito *et al.* ont montré que dans le cas du glioblastome, les astrocytes environnants fournissent de la glutamine aux cellules cancéreuses en conditions de privation, ce qui permet leur survie ; les cellules de gliome étant dépourvues de glutamine synthase, les astrocytes utilisent le glutamate de l'environnement afin de néosynthétiser de la glutamine ²⁹⁹.

1.2.1.3. Acquisition des nutriments par différents moyens

Malgré l'avidité des cellules tumorales pour le glucose et les acides aminés, ces cellules rencontrent souvent *in vivo* des conditions de pénurie en nutriments, en raison de l'augmentation des taux de consommation de ces éléments nutritifs ainsi que des insuffisances de l'apport vasculaire tumoral ^{262,300,301}. En l'absence de nutriments disponibles, les cellules malignes utilisent des voies métaboliques adaptées afin de maintenir leur viabilité ²⁶².

Le plasma et le fluide interstitiel sont des tissus riches en protéines solubles. En conditions physiologiques, ces protéines extracellulaires ne sont pas utilisées comme sources d'acides aminés. En revanche, les mutations acquises par les cellules tumorales, telles que RAS et c-SRC, permettent leur utilisation. Contrairement à l'absorption de nutriments de faible poids moléculaire qui entrent dans la cellule par des transporteurs dédiés, la capture de macromolécules extracellulaires est possible par macro-pinocytose, processus lors duquel le liquide extracellulaire est absorbé par des vésicules géantes. Ces vésicules fusionnent avec des lysosomes à l'intérieur de la cellule et les protéines solubles sont soumises à une dégradation protéolytique, libérant ainsi des acides aminés libres ^{262,300}. Ceux-ci peuvent également être obtenus suite à l'absorption et la digestion de cellules vivantes entières par entose (cannibalisme cellulaire), ou par phagocytose de corps apoptotiques des cellules environnantes. Les cellules digérées fusionnent également avec

des lysosomes et libèrent des acides aminés nécessaires à la survie et la prolifération des cellules transformées, notamment en conditions de pénurie nutritive ^{262,300}.

En outre, lors de longues périodes de privation en nutriments ou facteurs de croissance, les cellules tumorales activent le processus auto-catabolique de macro-autophagie. Ce processus permet de récupérer des substrats importants pour la synthèse de macromolécules et le fonctionnement cellulaire, après dégradation d'organites. En condition normale, seuls les organites endommagés ou les protéines aberrantes sont recyclées. Toutefois, les cellules cancéreuses utilisent ce mécanisme comme une adaptation métabolique aux conditions de stress ⁵⁵. Les macromolécules intracellulaires et organites entiers sont enveloppés par des structures à double membrane qui fusionnent avec les lysosomes, puis subissent une dégradation protéolytique afin de libérer les acides aminés et acides gras libres. Par exemple, les cellules HeLa activent la voie PI3K/AKT qui induit l'autophagie et favorise la survie cellulaire vis-à-vis des différents stress, dont la privation en nutriments ³⁰². Par exemple, ce processus permet l'apport en glutamine dans le cas du cancer du poumon ³⁰³.

Les cellules tumorales utilisent donc des modes d'acquisition de nutriments opportunistes, engendrant leur survie et prolifération malgré des conditions environnementales métaboliquement défavorables. Ces adaptations impliquent une capacité à accéder à des sources de nutriments normalement inaccessibles, et récupérer des molécules pré-maturées lorsque leur synthèse dans la cellule est compromise. Pour conclure, les interactions réciproques entre les cellules cancéreuses et leur micro-environnement imposent une pression sélective qui modifie davantage le métabolisme des cellules malignes et contribue activement à l'émergence d'un état plus agressif ²⁶². Enfin, des études préliminaires suggèrent que les métabolites produits par le microbiote, "organe oublié" de l'organisme, contribuent à l'initiation et à la progression d'une tumeur ³⁰¹.

1.2.2. Altérations géniques : oncogènes et suppresseurs de tumeurs

La prise de nutriments des cellules normales est régulée par des stimuli extracellulaires comme les facteurs de croissance ou des interactions cellule – MEC. Une privation en facteurs de croissance ne permet pas une consommation de glucose suffisante pour le maintien de la bio-énergétique cellulaire ; cela affecte la taille des cellules, le potentiel mitochondrial ainsi que la génération d'ATP, malgré l'abondance de glucose dans le milieu ^{262,301}. Cet effet est réversé après l'expression du transporteur de glucose GLUT1 et de l'Hexokinase, première enzyme de la voie glycolytique ²⁶². Les interactions cellules – MEC régulent également cette consommation de glucose. En effet, *in vitro*, l'utilisation de

glucose est compromise lorsque les cellules épithéliales sont détachées de la MEC. Ainsi, l'influx de glucose dans les cellules normales n'est pas dirigé par le besoin bio-énergétique immédiat, mais est le résultat de stimuli extracellulaires⁵⁵. Une tentative de prolifération d'une cellule en l'absence de ressources métaboliques appropriées engendrerait une mort certaine. Pour éviter cela, les cellules tumorales accumulent des altérations géniques leur permettant de consommer de façon excessive les métabolites du micro-environnement (glucose, glutamine, acides aminés essentiels), à l'origine de leur prolifération incontrôlée. L'accumulation de mutations, telles que l'activation de proto-oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, engendre une indépendance de ces cellules vis-à-vis des stimuli externes. L'activation aberrante de ces voies module la prolifération et la survie cellulaire et conduit à une ré-orientation métabolique, amenant à une modification et une activation des voies alternatives d'acquisition des nutriments en faveur d'une croissance tumorale⁵⁵. Toutefois, l'activation d'un même oncogène peut induire des modifications métaboliques hétérogènes d'un cancer à un autre. Par exemple, dans des modèles murins de surexpression de MYC de manière inductible et tissu-dépendante, les cellules pulmonaires ont un métabolisme du glucose augmenté suite à une surexpression des transporteurs de glucose et des enzymes LDH-A et HK2, ainsi qu'une consommation accrue de glutamine. En revanche, les cellules du foie ne présentent qu'une augmentation du taux de consommation de glucose²⁷². Il est donc important de déterminer le rôle exact de l'oncogène ou du gène suppresseur de tumeur selon le contexte cellulaire.

1.2.2.1. La voie PI3K/AKT/mTOR

Cette voie est associée à l'augmentation de la glycolyse ainsi qu'à l'activation du métabolisme mitochondrial et de la biosynthèse des mitochondries (**Figure 15**). Cela explique que des altérations géniques touchant des protéines de cette voie, comme la protéine régulatrice PTEN ou des récepteurs tyrosine kinases (RTK) et fréquemment décrites dans les cancers, conduisent à une modification du métabolisme et une consommation exarcerbée de glucose²⁶².

En 1996, Kohn et *al.* ont montré que AKT (*AKT Serine/Threonine Kinase*) augmente le nombre de transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT4 et phosphoryle les protéines glycolytiques HK2 et PKM2 (Pyruvate kinase 2) dans des cellules adipocytaires 3T3-L1^{262,304,212}. AKT potentialise l'activité de l'enzyme HK, prévenant l'efflux des molécules de glucose dans le milieu extracellulaire, et active la phospho-fructokinase (PFK), enzyme catalysant des étapes irréversibles de la glycolyse³⁰⁵. En outre, dans des conditions de déprivation en facteurs de croissance, l'expression exogène d'une forme constitutive d'AKT suffit à stimuler la glycolyse et restaurer une taille cellulaire normale, la survie de ces cellules, le potentiel mitochondrial et les niveaux d'ATP³⁰⁶.

Le métabolisme mitochondrial et la biosynthèse des mitochondries sont également régulés par la voie PI3K/AKT/mTOR. En effet, une forme de PTEN tronquée au niveau de son domaine N-terminal module l'activité mitochondriale en augmentant l'activité cytochrome C oxydase et la production d'ATP. L'invalidation de cette forme courte provoque un dysfonctionnement des mitochondries ³⁰⁷. De plus, mTORC1 favorise l'expression du facteur PGC1- α , inducteur de la biogénèse mitochondriale et de l'expression de gènes mitochondriaux impliqués dans la respiration mitochondriale ³⁰⁸.

Le facteur AKT est également associé à la transformation du citrate en acétyl-CoA par l'ATP citrate lyase (ACL) et joue un rôle dans la régulation de la transcription et la synthèse des acides gras ²⁶². L'acétyl-CoA cytosolique est un métabolite clé pour le support bio-énergétique, lorsque les cellules métabolisent le glucose plus que nécessaire. L'augmentation du taux extra-mitochondrial d'acétyl-CoA induit la synthèse *de novo* des acides gras suite à sa carboxylation par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), le transformant en malonyl-CoA. Celui-ci est ensuite utilisé lors de l'assemblage des chaînes d'acides gras par la FASN ²⁶². D'autre part, l'acétyl-CoA, également connu comme substrat d'enzymes acétylatrices des histones et autres protéines, permet l'expression de divers gènes en simplifiant l'accessibilité de l'ADN aux complexes transcriptionnels. Cela explique la sensibilité du phénomène d'acétylation des histones aux altérations des voies nutritives cellulaires et de signalisation ²⁶².

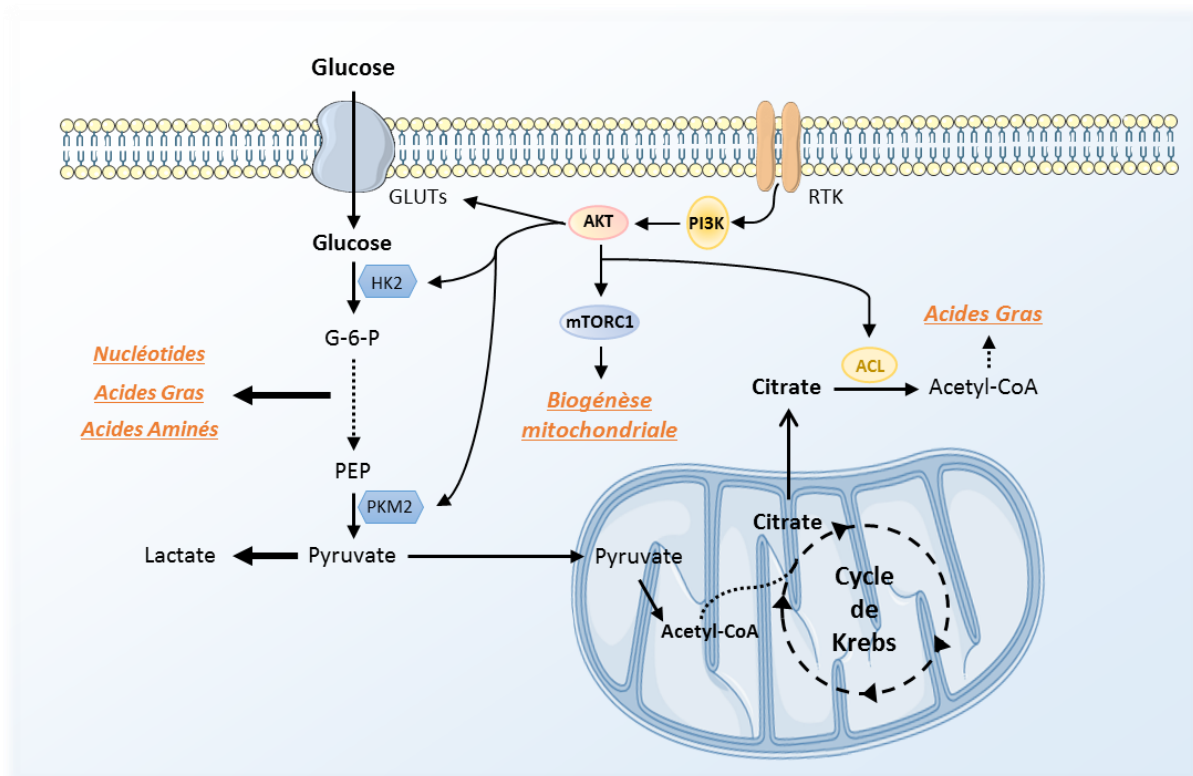


Figure 15: Voie PI3K/AKT/mTOR et métabolisme des cellules tumorales.

L'activation de cette voie favorise la glycolyse à travers l'augmentation de l'expression des transporteurs de glucose GLUTs et des enzymes glycolytiques. Cette voie peut également induire la biogénèse mitochondriale et la synthèse des acides gras suite à l'activation de mTORC1 et de l'enzyme ATP citrate lyase (ACL), respectivement.

1.2.2.2. La voie LKB1/AMPK

Contrôlant l'axe PI3K/AKT, la voie LKB1 (*Liver Kinase B1*)/AMPK régule le métabolisme énergétique. L'AMPK (*AMP-Activated Protein Kinase*), senseur du statut énergétique cellulaire et notamment des changements dans le ratio AMP/ATP, est activé en condition de stress métabolique (hypoxie ou privation en nutriments). Son activation inhibe la prolifération cellulaire et induit un *switch* de la glycolyse vers l'OxPHOS. Dans les leucémies aiguës lymphoblastiques, l'AMPK supprime l'activité de mTORC1, engendrant une diminution de la glycolyse et une élévation de l'activité du complexe I mitochondrial. Cela conduit à une forte production d'ATP et à la survie des cellules à un stress métabolique^{267,309,310}. De plus, l'activation de p38/PGC1- α par l'AMPK favorise la biogénèse mitochondriale mais aussi, de manière plus étonnante, la glycolyse par PFK2. Cet effet permet la génération rapide du stock d'ATP nécessaire à la survie des cellules. La synthèse d'ATP est également permise suite à une utilisation accrue de glucose et d'acides gras par la mitochondrie, due à l'activation de PGC1- α par l'AMPK³¹¹. Dans le cancer du poumon, la mutation du gène suppresseur de tumeur *LKB1*, régulateur positif de l'AMPK, est associée à une hyper-activation de la voie mTORC1 et de HIF-1 α , en faveur d'un métabolisme glycolytique et de la formation de métastases³¹².

1.2.2.3. Voie MAPK

L'activation constitutive de cette voie (RAS, RAF, MEK et ERK), notamment due à la mutation BRAFV600E, est fréquemment retrouvée dans les mélanomes. Elle est associée à une augmentation de la glycolyse HIF-1 α dépendante, même en présence d'oxygène, en accentuant la captation de glucose et l'expression d'enzymes glycolytiques HK2 et LDH-A. Par ailleurs, cette voie induit l'expression du transporteur GLUT1 et de l'enzyme PDK3 dans des cellules de mélanome, réduisant ainsi la phosphorylation oxydative au profit d'un métabolisme glycolytique^{313,314}.

1.2.2.4. MYC

Ce facteur de transcription, proto-oncogène, a un rôle important dans le métabolisme tumoral. S'il est exprimé et activé en réponse à des facteurs de croissance en conditions physiologiques, cette protéine est souvent surexprimée et activée de façon constitutive suite à une mutation ou translocation chromosomique dans les pathologies cancéreuses.

Ce facteur possède un rôle important dans le métabolisme du glucose, de la glutamine et de la biogénèse mitochondriale (**Figure 16**). Il stabilise le facteur HIF-1 α et provoque la prolifération, migration et angiogénèse *in vivo*, ainsi qu'un métabolisme glycolytique après expression des transporteurs de glucose et enzymes PDK1, HK2, PKM2 et LDH-A³¹⁵. Cette voie MYC/HIF-1 α réprime l'utilisation de pyruvate par la mitochondrie en favorisant sa conversion en lactate²⁶⁵. L'efflux de lactate dans le milieu extracellulaire est permis par une surexpression du transporteur monocarboxylate MCT1³¹⁵.

D'autre part, des fibroblastes de rat MYC-déficients ont une masse et un nombre de mitochondries plus faibles ; cela met en évidence le rôle de MYC dans l'activation de gènes nucléaires codants des protéines mitochondriales ou impliquées dans la réplication de l'ADN mitochondrial³¹⁵.

L'activité constitutive de ce facteur promeut le métabolisme de la glutamine et les voies carbonées qui lui sont associées. Ainsi, la privation en glutamine de cellules transformées c-MYC conduit à une inactivation du cycle de Krebs suivie de la mort cellulaire. Cet effet est réversé après addition d'oxaloacétate ou d' α -kétoglutarate dans le milieu³⁰⁵. Cette dépendance en glutamine a notamment été démontrée dans des modèles de lymphome et cancer du pancréas, pour lesquels sa captation est facilitée par des transporteurs [SLC5A1, SLC7A1 ; *Solute Carrier Family 5/7 Member 1*] ou par des protéines importatrices [ASCT2 (Transporteur Alanine-Sérine-Cystéine 2) ; SN2 (*System N Transporter 2*)]. La glutamine est ensuite utilisée par la mitochondrie dans le cycle de Krebs après avoir été convertie en glutamate par des enzymes GLS1 et GLS2, également surexprimées³⁰⁵. Donneur de nitrogène, le glutamate est un substrat pour la production d'acides aminés non essentiels et le métabolisme de la proline. Celle-ci est synthétisée à partir du glutamate ou de l'arginine dérivée de l'ornithine *via* un intermédiaire commun, la pyrroline-5-carboxylate. Aussi, MYC provoque la surexpression des enzymes P5CS (*Pyrroline-5-carboxylate synthase*) et PYCR1 (Pyrroline-5-carboxylate réductase) et module ce métabolisme de la proline²⁶². Enfin, les enzymes PRPS2 (phosphoribosyl pyrophosphate synthétase 2) et CAD (*carbamoyl phosphate synthetase 2*), impliquées respectivement dans la biosynthèse des nucléotides puriniques et pyrimidiques, sont surexprimées après activation de MYC²⁶².

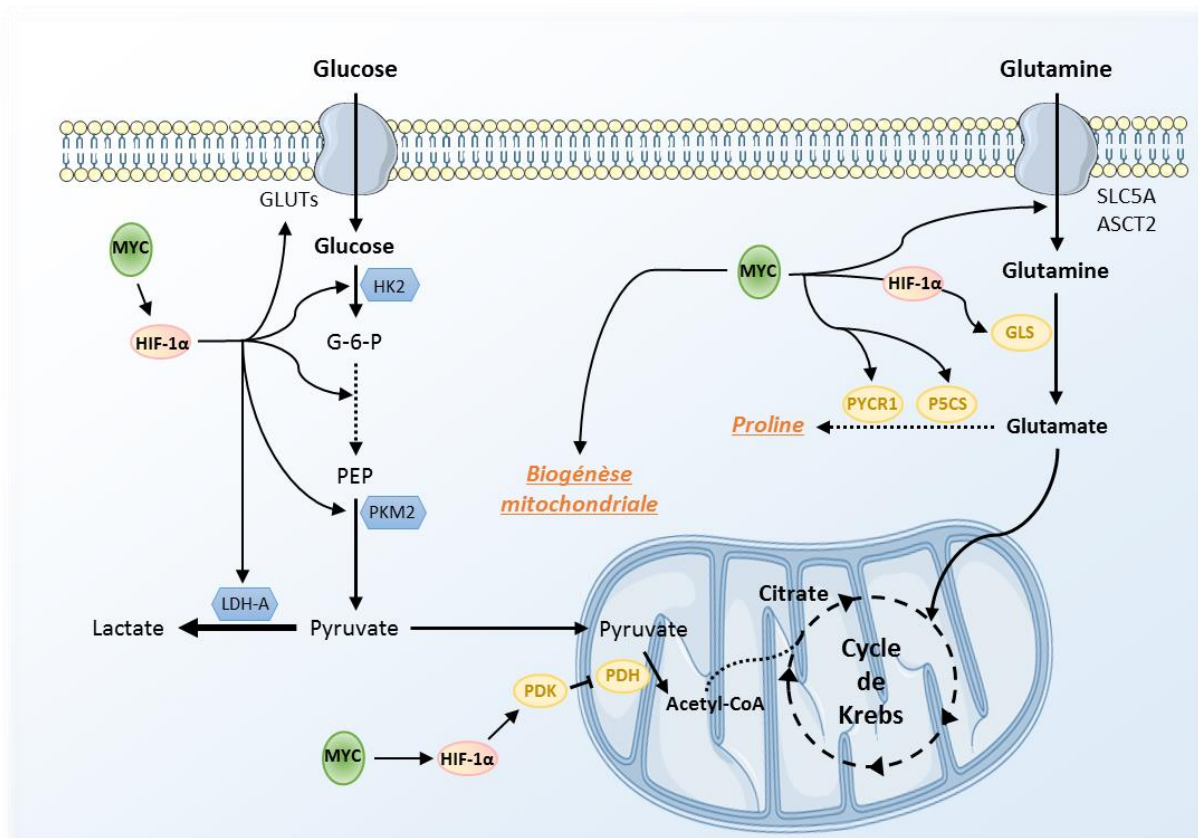


Figure 16: Implication du facteur Myc dans le métabolisme cellulaire.

La protéine MYC joue un rôle dans le métabolisme du glucose, de la glutamine et de la biogénèse mitochondriale en stabilisant le facteur HIF-1 α . Elle peut également induire directement l'expression des transporteurs de la glutamine SLC5A et ASCT2.

1.2.2.5. HIF-1 α

Le facteur de transcription HIF-1 (*Hypoxia-inducible factor-1*), activé en réponse à l'hypoxie, est composé de deux sous-unités. L'expression de la sous-unité α dépend de la concentration en oxygène de l'environnement cellulaire, alors que la sous-unité β est exprimée de façon constitutive. En normoxie, la protéine HIF-1 α est hydroxylée par les prolyles hydroxylases 1 et 2 (PHD), ubiquitinylée par la protéine VHL (*Von Hippel-Lindau*) puis dégradée par le protéasome. A l'inverse, en absence d'oxygène, l'activité de la protéine PHD est diminuée et HIF-1 α stabilisée. Elle peut ainsi transloquer dans le noyau et former un hétéro-dimère avec la sous-unité HIF-1 β . Cette forme active peut se lier sur les séquences consensus HRE (*Hypoxia Response Element*) et induire la transcription des gènes cibles après recrutement de co-activateurs comme CBP [*CREB (cAMP Responsive Element Binding Protein)-binding protein*] (**Figure 17**)^{316,317}. Toutefois, dans les cellules tumorales, la protéine HIF-1 α est stabilisée même en condition de normoxie, par des voies de signalisation oncogéniques (BRAF, MYC, PI3K/AKT) ou par inactivation de gènes suppresseurs de tumeur (VHL). Une production élevée d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) supprime l'action des enzymes PHDs et permet la stabilisation de HIF-1 α ^{265,316}. D'autre part, des

mutations d'enzymes mitochondriales telles que la succinate déshydrogénase (SDH) ou la fumarate hydratase (FH) induisent une accumulation de métabolites (succinate et fumarate), conduisant à la stabilisation du facteur de transcription ³¹⁷.

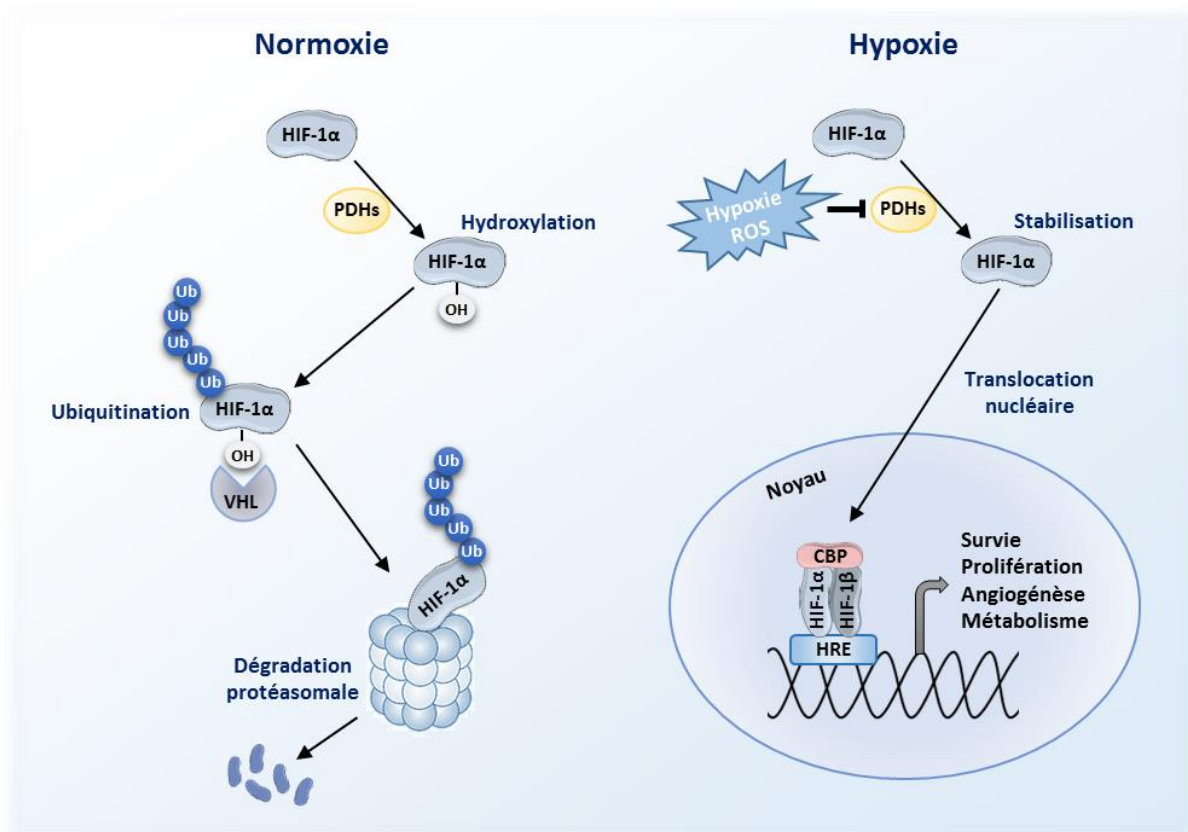


Figure 17: Conditions de stabilisation et d'activation du facteur HIF-1.

En condition de normoxie, la sous-unité HIF-1 α est hydroxylée par des prolylhydroxylases (PHDs) puis ubiquitinylée par Von Hippel-Lindau (VHL), provoquant sa dégradation protéasomale. A l'inverse, en condition d'hypoxie, l'activité des PHDs est diminuée. Cela permet la stabilisation de HIF-1 α suivie de sa translocation nucléaire et sa dimérisation avec la sous-unité HIF-1 β . Le dimère HIF-1 peut ensuite transcrire ses gènes cibles possédant une séquence HRE (Hypoxia Response Element), impliqués dans la survie, prolifération, angiogénèse et le métabolisme.

La protéine HIF-1 régule la prolifération, l'apoptose, l'angiogénèse et possède un rôle clé dans la reprogrammation du métabolisme énergétique. Suite à une disponibilité réduite en oxygène, HIF-1 médie de nombreuses réponses adaptatives telles que l'absorption accrue de glucose et de glutamine, la glycolyse et la synthèse de glycogène, la réduction du catabolisme du pyruvate ainsi que la consommation d'O₂ par les mitochondries ³¹⁷.

HIF-1 α a été rapidement identifié comme un contributeur important à l'effet Warburg, en induisant l'expression de gènes codant des transporteurs de glucose (GLUT1 et GLUT3) et des enzymes glycolytiques, telles que des PDK et de la LDH-A ³⁰⁶. L'oxydation du pyruvate en acétyl-CoA nécessaire pour le cycle de Krebs étant inhibée par les PDK, HIF-1 α joue

donc un rôle dans la suppression du métabolisme mitochondrial. De plus, le transporteur MCT4, qui assure l'efflux de lactate hors de la cellule, est régulé positivement par HIF-1 α . Distinctement, HIF-2 ne permet pas l'expression d'enzymes glycolytiques régulés par HIF-1 α , mais peut indirectement produire des effets similaires en renforçant l'activité de MYC ou d'autres facteurs pro-glycolytiques ³¹⁷.

En plus d'augmenter l'activité de glycolyse, les facteurs HIF ont une fonction fondamentale qui est d'induire l'arrêt de production des ROS par la chaîne mitochondriale de transport d'électrons. L'élévation des niveaux de ROS mitochondriaux lors de conditions hypoxiques semble contribuer à la stabilisation des sous-unités α de HIF-1, bien qu'une controverse persiste sur ce point ³¹⁷. Induits par hypoxie ou signalisation oncogénique, les facteurs HIF limitent le stress oxydant par différents mécanismes, comme la diminution du métabolisme mitochondrial oxydatif, générateur de ROS intracellulaires et de stress d'oxydo-réduction ³¹⁷. En outre, la synthèse du glutathion, anti-oxydant crucial pour le maintien de l'équilibre redox intracellulaire, nécessite du NADPH généré par la voie des pentoses phosphate (PPP), branche de la glycolyse. Il a été rapporté que le facteur HIF-1 favorise la localisation mitochondriale de certaines cibles de la protéine p53, dont TIGAR (*TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator*) qui fonctionne comme la fructose 2,6-bisphosphatase et entraîne une activité élevée de HK2 et un flux de PPP accentué ³¹⁷. Comme de nombreuses voies oncogéniques favorisant la glycolyse (BCR-ABL, AKT, MYC, PTEN et autres) de manière HIF-dépendante et indépendante, la capacité de HIF à moduler le flux de carbone et à limiter la production de ROS, nuisibles, s'avère être une fonction métabolique cruciale, quel que soit le contexte oncogénique ³¹⁷.

1.2.2.6. p53

Environ 50% des cancers ont une mutation ou délétion complète du gène suppresseur de tumeur *TP53* codant la protéine p53 ³¹⁸. Ce facteur de transcription régule l'homéostasie cellulaire (cycle cellulaire, apoptose) et la réponse aux stress à l'origine de dommages à l'ADN. Lors d'un stress basal ou de faible amplitude, p53 aide à contrer ou réparer les dommages cellulaires. En revanche, lorsqu'un stress génotoxique persiste ou après activation oncogénique, cette protéine provoque la sénescence voire l'apoptose des cellules, en réponse à des dommages majeurs et irréversibles.

Outre son rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire induit par la molécule p21, des données émergentes suggèrent que p53 est également impliquée dans la régulation du métabolisme et de l'homéostasie cellulaire (**Figure 18**), sans provoquer l'arrêt du cycle cellulaire ni l'apoptose ^{319,320}. Par exemple, une déficience en nutriments conduit à l'activation de p53 par phosphorylation directe de sa sérine 15 par l'AMPK, régulateur clé du métabolisme ³¹⁹. Réciproquement, p53 favorise l'expression de l'AMPK et conduit à une régulation négative

de la voie mTOR. Celle-ci peut supprimer l'apoptose et stimuler l'expression génique pro-inflammatoire, qui à son tour engendre la croissance et la progression du cancer. Aussi, la régulation négative de mTOR est observée lors du processus d'autophagie et peut être induite après un stress métabolique ou suite à des conditions de privation en nutriments ³¹⁹.

D'autre part, p53 supprime l'effet Warburg en réduisant la glycolyse et en augmentant la phosphorylation oxydative. Ce phénomène est la cause d'une surexpression des gènes codant les protéines TIGAR et SCO2 (*cytochrome c oxidase assembly protein 2*), ainsi que de l'inhibition des transporteurs de glucose GLUT1, GLUT3 et GLUT4. L'enzyme SCO2 augmente la respiration mitochondriale alors que TIGAR inhibe la glycolyse et promeut la production de NADPH et le recyclage du glutathion, régulant ainsi la réponse à un stress oxydant ³¹⁹. Par ailleurs, l'expression de l'enzyme glutaminase 2 permise par p53 promeut le métabolisme de la glutamine et la production de ROS ³²¹.

Dans différents types de cancers, des mutations de ce facteur de transcription stimulent le phénotype Warburg ; cet effet est réversé après l'expression d'une forme sauvage de p53 ³¹⁹. Effectivement, la protéine p53 WT (*Wild-type*), contrairement aux mutants, supprime la voie des pentoses phosphates en se liant et inactivant l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) ³²². Les mutants de p53 facilitent l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse des nucléotides (Inosine monophosphate déshydrogénase 1/2 (IMPDH1/2); GMP synthétase (GMPS) ; déoxycytidine kinases (DCK) ; thymidine kinase (TK1)) ³²³. La proline oxydase (POX), responsable de la dégradation de la proline, est également une cible de p53 ³²⁴.

Pour résumer, p53 régule un certain nombre de gènes afin de maintenir le métabolisme et l'homéostasie énergétique.

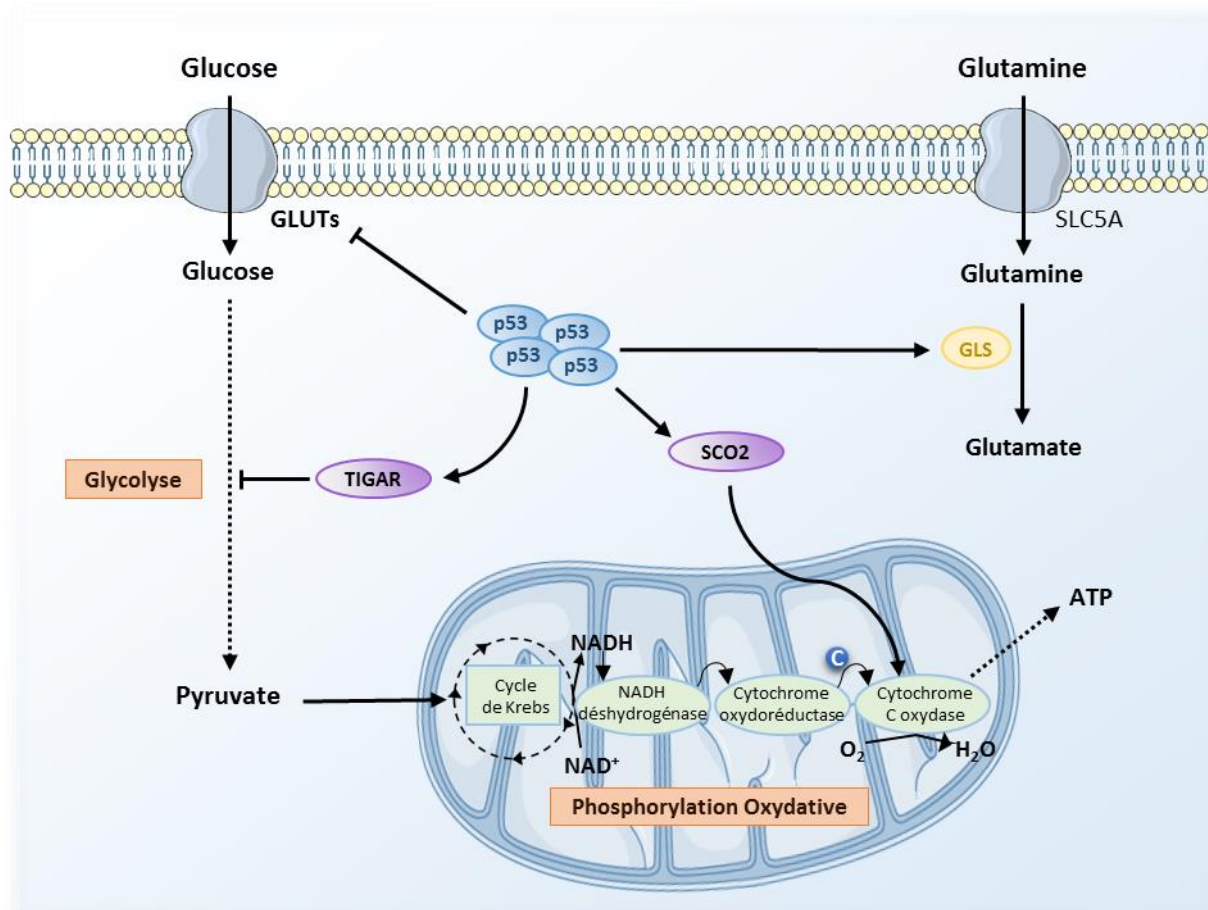


Figure 18: Régulation du métabolisme cellulaire par la protéine p53.

L'activation de p53 réduit la voie de la glycolyse en diminuant l'expression des transporteurs de glucose GLUTs et de TIGAR (TP53-induced Glycolysis and Apoptosis Regulator). En revanche, p53 favorise la phosphorylation oxydative en sur-régulant l'expression de la protéine SCO2 (Cytochrome c oxidase assembly protein 2). Par ailleurs, le métabolisme de la glutamine est permis par p53 après expression de GLS2 (glutaminase 2).

1.2.2.7. RAS

La protéine oncogénique RAS induit une élévation de l'expression de l'ARNm *GLUT1* et augmente la consommation de glucose par les cellules ²⁶². Par ailleurs, cette molécule active les voies de macro-pinocytose, entose et phagocytose afin de récupérer des acides aminés présents dans le plasma et les fluides interstitiels tissulaires riches en protéines solubles, et nécessaires à la survie et prolifération des cellules tumorales en condition de privation ^{262,301}. Ces phénomènes contribuent à la compétition cellule-cellule au sein des tumeurs et engendre l'émergence de populations cellulaires plus agressives. De plus, une mutation du gène codant RAS engendre la surexpression des enzymes de la voie des pentoses phosphates, impliquées dans la biosynthèse du Ribose-5-phosphate, utilisé lors de la synthèse des nucléotides ³⁰¹.

1.2.3. Enzymes métaboliques altérées lors d'un cancer

Dans le cas de cellules cancéreuses, le phénotype Warburg est favorisé suite à la dérégulation d'une multitude d'enzymes impliquées dans la voie de la glycolyse, telles que l'hexokinase 2, la phospho-fructokinase-1, la pyruvate kinase 2, la pyruvate déshydrogénase kinase et la phosphoglycérate déshydrogénase (PHGDH), dont les expressions sont fortement augmentées dans la majorité des tumeurs (**Figure 10, p. 70**).

La transformation du glucose en G-6-P, première réaction irréversible de la glycolyse nécessitant de l'ATP, est catalysée par l'enzyme **Hexokinase 2**. Son expression aberrante fréquemment retrouvée dans les cellules cancéreuses peut être due à une dérégulation de la protéine HIF-1 α , une amplification de son gène ou la déméthylation de son promoteur ³²⁵.

D'autre part, le point de contrôle majeur de la glycolyse est la conversion du F-6-P en F-1,6-BP (Fructose-1,6-bisphosphate), réaction limitante et irréversible. Cette étape est catalysée par la **Phospho-fructokinase-1** (PFK1), principal stimulateur de la glycolyse ³²⁶. La PFK1 est régulée par divers substrats tels que l'ATP et le citrate qui l'inhibent, ou le fructose-2,6-bisphosphate qui augmente son activité ³²⁶.

La dernière réaction de la glycolyse est quant à elle catalysée par la **pyruvate kinase M2** (PKM2), qui convertit le phosphoénolpyruvate (PEP) en pyruvate et produit de l'ATP. La PKM2 est surexprimée dans de nombreux cancers et accentue la prolifération, l'invasion et la survie cellulaires ³⁰¹. De plus, elle confère un avantage aux cellules malignes en ralentissant la glycolyse et en favorisant les réactions anapérotyques comme la voie des pentoses phosphates et celle de la sérine ²⁶². Induite par l'oncogène MYC, PKM2 participe à l'activation des facteurs de transcription HIF-1 α et STAT3, augmentant ainsi l'expression de leurs gènes cibles et favorisant le développement tumoral ^{315,327,328}.

En outre, lors de conditions de privation en nutriments, l'activation des enzymes **Pyruvate Déshydrogénase Kinases** (PDK) par les espèces réactives de l'oxygène et l'AMPK promeut le phénotype Warburg. Les PDKs régulent négativement le complexe pyruvate déshydrogénase (PDC) responsable de la transformation du pyruvate en acétyl-CoA, utilisé par le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire mitochondriale ^{329,330}. Dans les pathologies cancéreuses, la stabilisation du facteur HIF-1 α par PDK1 et PDK3 en font les principales isoformes liées à cet effet Warburg ^{268,330}. A ce titre, l'inhibition des PDKs engendre un *switch* de la glycolyse à la phosphorylation oxydative du métabolisme des cellules cancéreuses, et peut constituer une approche efficace pour traiter le cancer ³³⁰.

Enfin, une fraction de cellules malignes de sein et de mélanome surexprime la **phosphoglycérate déshydrogénase** (PHGDH), enzyme catalysant la conversion du 3-phosphoglycérate (3-PG) en 3-phosphohydroxypyruvate, première étape de la voie de

biosynthèse de la sérine ²⁶⁷. Les lignées cellulaires caractérisées par une surexpression de PHGDH présentent une augmentation du flux de la voie de biosynthèse de la sérine, nécessaire à la synthèse d'acides aminés. Toutefois, il est surprenant de constater que la suppression génique de PHGDH dans des lignées cellulaires mammaires n'affecte pas les taux de sérine intracellulaire, mais provoque une réduction des taux d' α -KG. En réalité, la voie de la sérine est responsable de près de 50% de la conversion du glutamate en α -KG dans le cas de l'anaplérose médiée par la glutamine, dans les cellules surexprimant PHGDH ²⁶⁷.

Des mutations impactant les enzymes impliquées dans des fonctions mitochondriales peuvent également causer une accumulation de métabolites et notamment lorsque leurs voies de consommation sont sous-activées ou abolies. Parmi ces enzymes responsables de la formation d'onco-métabolites, se trouvent l'isocitrate déshydrogénase (IDH), la SDH et la FH.

Observées dans des cas de gliome, chondrosarcome, cholangiocarcinome et de leucémies aiguës myéloïdes, les mutations ponctuelles des gènes *IDH1* ou *IDH2* confèrent aux enzymes produites une activité de synthèse de l'onco-métabolite 2-hydroxyglutarate (2-HG) et son accumulation ³³¹. L'effet tumorigène lié aux mutations *IDH* semble être lié en partie à une hyperméthylation génique, causant une répression de l'expression de nombreux gènes. Cette dérégulation génique et la production d'onco-métaboliques impactent le métabolisme du glucose, de la glutamine, des lipides, le cycle de Krebs et l'équilibre redox des cellules ^{331,332,333}.

De manière intéressante, de récentes études suggèrent que l'accumulation de succinate et fumarate dans les tumeurs respectivement déficientes en SDH et FH, peut entraîner des modifications épigénétiques similaires ²⁶⁷. De plus, ces deux métabolites permettent une stabilisation et l'activation aberrante de HIF-1 α suite à l'inhibition compétitive de la prolyl hydroxylase 2 (PHD2), dont le rôle est de marquer HIF-1 α pour l'ubiquitination effectuée par la protéine VHL ²⁶⁷. Par ailleurs, la production et l'accumulation de fumarate dans des cellules FH-déficientes est requise pour l'élévation du niveau de ROS intracellulaire, également responsable de l'activation de la voie HIF-1 α et des adaptations métaboliques subséquentes ³³⁴. Toutefois, le fumarate peut engendrer la succination de KEAP1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), régulateur négatif du facteur de transcription anti-oxydant NRF2 ; cette modification post-traductionnelle provoque l'activation de NRF2, l'expression de ses gènes cibles anti-oxydants et l'atténuation du taux de ROS intracellulaires dans des cellules déficientes en FH ³³⁴.

2. Stress oxydant et métabolisme cellulaire

2.1. Stress oxydatif : définition et origines

La production d'espèces réactives de l'oxygène, processus essentiel pour le maintien de l'homéostasie corporelle, est régulée par un équilibre entre taux de production et taux d'élimination par les systèmes anti-oxydants³³⁵. Ces composés issus du métabolisme oxydatif et normalement à faible concentration, sont nécessaires aux événements sub-cellulaires comme la transduction du signal, l'activation enzymatique, l'expression génique, la formation de liaisons disulfure lors du repliement de nouvelles protéines dans le réticulum endoplasmique et le contrôle de l'activité caspase au cours de l'apoptose³³⁵. De ce fait, une rupture de l'homéostasie redox engendre un excès de ROS et un stress oxydatif, responsable de l'altération et l'endommagement de nombreuses molécules intracellulaires dont l'ADN, l'ARN, les lipides et les protéines, pouvant conduire à la mort des cellules (Figure 19)^{336,337}.

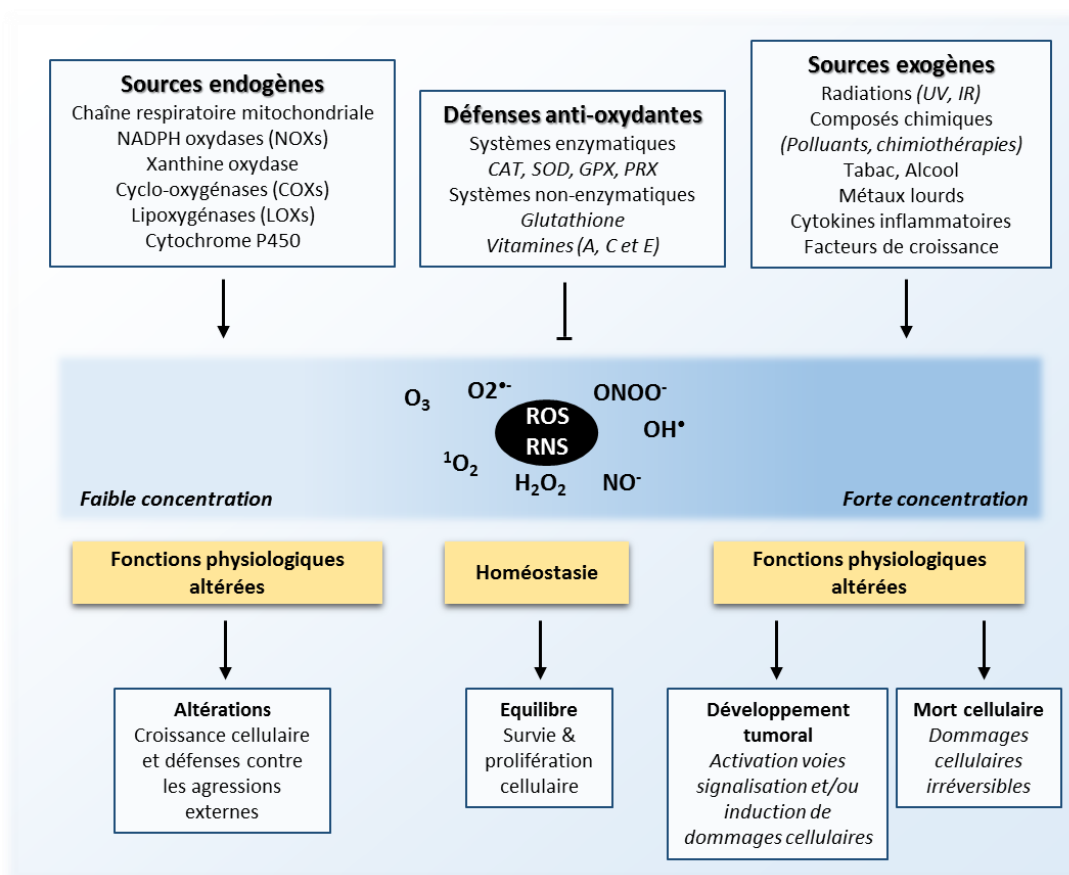


Figure 19: Différentes sources de ROS et conséquences selon leur concentration. Les ROS peuvent être produites selon des sources endogènes et exogènes, et détruites par divers systèmes anti-oxydants. Un équilibre entre systèmes pro- et anti-oxydants résulte en un état d'homéostasie. En revanche, lorsque les concentrations cellulaires de ROS sont trop faibles ou trop importantes, cela altère les fonctions physiologiques pouvant être responsable d'un développement tumoral. Adapté de³³⁸.

Les espèces réactives peuvent être classées en quatre groupes en fonction de l'atome principal impliqué: ROS, espèces réactives de l'azote (RNS), espèces réactives du soufre (RSS) et espèces réactives du chlorure (RCS). De tous les composés dérivés du métabolisme oxydatif, les ROS sont les plus abondamment produits et comprennent l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), l'oxygène singulet (1O_2) et l'ozone (O_3). Les RNS les plus retrouvés sont l'oxyde nitrique (NO^{\cdot}) et l'anion peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$), produit par l'interaction entre l'anion superoxyde et l'oxyde nitrique^{339,340}.

2.1.1. Production de ROS en conditions physiologiques

En conditions physiologiques, les sources internes de stress oxydatif comprennent les peroxysomes, les réactions enzymatiques impliquant les enzymes détoxifiantes du complexe P450, la xanthine oxydase, les lipoxygénases (LOXs), les cyclo-oxygénases (COXs), les NADPH oxydases (NOXs), ainsi que la chaîne respiratoire mitochondriale, principale source de ROS³³⁹. Le cycle de Krebs produit des intermédiaires énergétiques que sont le NADH et $FADH_2$, utilisés respectivement par les complexes I et II de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Figure 8, p. 67**). L'oxydation de ces intermédiaires par le flux d'électrons s'accompagne d'un gradient de protons et conduit à la production d'ATP. L'oxygène, dernier accepteur d'électrons, permet l'obtention d' H_2O (complexe IV). Toutefois, des électrons libérés lors de ces réactions et notamment au niveau des complexes I, II et III, peuvent réagir avec l' O_2 présent dans la matrice mitochondriale et générer un anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$. On estime qu'environ 0,2 à 2% de l'oxygène consommé par la cellule est impliqué dans la production de ROS. Le complexe III peut aussi produire de l' $O_2^{\cdot-}$ dans l'espace inter-membranaire mitochondrial^{340,341}. Par ailleurs, l'inhibition par l'IF1 (*ATPase inhibitory factor-1*) de l'ATP synthase considérée comme le complexe V, est associée à une augmentation de la production de ROS mitochondriales³⁴².

Récemment, il a été montré dans le cas du cancer de la prostate que la génération de ROS peut être induite par l'enzyme MAOA (Monoamine oxydase A), exprimée au niveau de la membrane mitochondriale externe et intervenant dans le catabolisme des monoamines³⁴³.

Des sources dites « externes » de stress oxydant existent et comprennent les rayonnements UV, les composés chimiques tels que les polluants environnementaux, ainsi que le tabac et l'alcool.

2.1.2. Production de ROS lors de pathologies tumorales

Des études récentes démontrent que les cellules cancéreuses, par rapport aux cellules normales, sont soumises à un stress oxydatif accru associé à la transformation oncogénique, à des altérations de l'activité métabolique et à une augmentation des espèces réactives de l'oxygène ³⁴⁴. Toutefois, à l'heure actuelle, nous ne savons pas si les niveaux élevés de ROS sont la cause ou la conséquence de la cancérogénèse ³⁴⁵.

Même si les sources de ROS des cellules malignes sont identiques à celles de cellules normales, leur fonctionnement est altéré suite à des modifications aberrantes d'expression ou d'activité, expliquant cette production de ROS exacerbée. Notamment, les enzymes NADPH oxydases, au nombre de sept (NOX1 à 5, DUOX1, DUOX2), utilisent le NAD(P)H pour catalyser la réduction de l'O₂ en O₂⁻ et sont dérégulées dans les cancers ³⁴⁶. Par exemple, NOX1 et NOX4 sont surexprimées respectivement dans les adénocarcinomes du colon, ainsi que les mélanomes et carcinomes rénaux ³⁴⁷⁻³⁴⁹. Ces protéines engendrent une activation constitutive du facteur NF-κB impliqué dans la survie cellulaire, ainsi qu'une production d'IL-6 et IL-8 associée à un phénotype inflammatoire et invasif ³⁴⁷⁻³⁴⁹. D'autre part, l'expression des cyclo-oxygénases et lipoxygénases est augmentée dans de nombreux types de tumeurs ³⁵⁰.

Les altérations géniques, métaboliques et environnementales contribuent également à la production de ROS. Si peu de cellules tumorales ont un métabolisme mitochondrial dysfonctionnel, cette caractéristique reste associée aux cancers, entre autre par l'altération de l'ADN génomique et/ou mitochondrial codant des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) et perturbant ainsi sa fonctionnalité ³⁵¹. Une diminution de l'efficacité de la CRM dans le transport d'électrons provoque une élévation des fuites d'électrons, leur réaction avec l'O₂ et la production d'anion superoxyde O₂⁻ ³⁴². Similairement, des protéines impliquées dans le cycle de Krebs comme la SDH et la FH peuvent être mutées, ce qui conduit à l'accumulation d'intermédiaires métaboliques et à la production de ROS ³⁵¹.

Par ailleurs, l'hyper-activation des oncogènes a longtemps été associée à des taux de ROS mitochondriaux élevés. Par exemple, l'induction de l'expression de KRAS engendre un dysfonctionnement des mitochondries et une production de ROS favorisant le développement tumoral. A l'inverse, les ROS produites à partir du complexe III sont nécessaires pour la tumorigénèse médiée par KRAS en régulant la voie de signalisation ERK/MAPK ³⁵¹. De même, l'activité d'autres oncogènes, tel que MYC, contribue à la prolifération et survie des cellules malignes après génération de ROS mitochondriaux, concomitante d'une élévation des taux de dommages à l'ADN dus à un stress oxydatif ³⁵¹.

Afin d'exercer leurs effets biologiques variés, dont la promotion tumorale, les facteurs de croissance et cytokines stimulent la production de ROS. Ainsi, une élévation des niveaux de

peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et d'oxyde de nitrite NO^- a été détectée dans les cellules tumorales en réponse à l'IFN- γ et au TNF- α ³³⁷. En outre, le facteur de croissance dérivé des plaquettes PDGF, le facteur de croissance épidermique EGF, l'insuline, le TGF- β , l'IL-1, le TNF- α , l'angiotensine et l'acide lysophosphatidique sont tous capables d'engendrer la formation d'anion superoxyde O_2^- ³³⁷. L'activation de KRAS en aval des facteurs de croissance ou sa mutation oncogénique sont étroitement associées à une augmentation de la production de superoxyde et à l'incidence de cancers ³³⁷.

Dans le micro-environnement tumoral, le stress oxydatif a une origine intrinsèque ou extrinsèque, l'hypoxie et certains composants stromaux tels que les CAF et TAM pouvant favoriser un environnement pro-oxydant, propice à la progression tumorale et la propagation des métastases ³³⁶. Les TAM génèrent des ROS par activation de NOX2 et la sécrétion de TNF- α , tandis que l'hypoxie produit des espèces oxydantes par dérégulation du complexe III du transport mitochondrial d'électrons ou par l'activité de la NADPH oxydase ^{336,337}. De plus, les CAF activés en réponse au stress oxydatif produisent des cytokines et protéases participant à la progression tumorale. En effet, le stress engendré par le vieillissement cellulaire amène à la sécrétion de SASP (*Senescent Activated Secretory Pathway*) par les fibroblastes sénescents, affectant à la fois le stroma et les cellules cancéreuses ^{298,336}.

2.2. Conséquences d'un stress oxydatif

A faible concentration, les ROS ont un rôle physiologique et servent de seconds messagers dans les voies de signalisation impliquées dans la survie et la prolifération cellulaires ³⁵². Une augmentation modérée du taux de ROS comme le superoxyde O_2^- et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 contribue au développement tumoral, ces espèces agissant en tant que molécules de signalisation ou en induisant des dommages oxydants au niveau de macromolécules. En revanche, à des niveaux élevés, les ROS engendrent de graves dommages cellulaires pouvant conduire à la mort cellulaire. Aussi, pour lutter contre ces hauts niveaux d'oxydation, les cellules cancéreuses doivent s'adapter et contrebalancer ce stress en mettant en place de puissants mécanismes anti-oxydants. Cette capacité anti-oxydante élevée régule les ROS à des niveaux compatibles avec les fonctions biologiques cellulaires, mais toujours plus élevés que dans les cellules normales ³⁵².

2.2.1. Composants cellulaires et dommages oxydatifs

Des niveaux élevés de ROS peuvent conduire à des dommages non spécifiques de macromolécules telles que l'ADN, les protéines et les lipides ³³⁷.

2.2.1.1. Dommages à l'ADN et instabilité génique

Les dommages causés par les ROS sont considérés comme le type de lésion de l'ADN le plus courant. Certaines ROS tels que H_2O_2 ne sont pas très réactives au niveau de l'ADN et la plupart des effets dommageables sont dus aux ions hydroxyles OH^\cdot ³³⁷. En raison de leur nature chimique réactive, ces radicaux hydroxyles sont capables d'attaquer divers composants de l'ADN, conduisant à la formation de lésions, de type oxydation des bases d'ADN, cassures simple brin voire double brin³³⁷. La guanine est la base azotée la plus couramment altérée ; son oxydation conduit à la génération d'un dérivé, le 8-oxo-guanine, responsable de l'insertion erronée de bases lors de la réplication de l'ADN et de transversions de type GC \rightarrow TA, à l'origine de diverses mutations³⁴⁴. Par ailleurs, les radicaux superoxydes $O_2^{\cdot-}$ générés dans les mitochondries peuvent causer des dommages non seulement au niveau de l'ADN mitochondrial (ADNmt), mais aussi au niveau de l'ADN nucléaire (ADNn) par leur conversion en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , relativement stable et capable de diffuser jusqu'au noyau³⁴⁴. Par rapport à l'ADNn, l'ADNmt est plus susceptible d'être endommagé par les ROS en raison de sa proximité avec le site de génération de ces espèces réactives de l'oxygène, de son absence d'introns et d'histones ainsi que par la limitation des capacités de sa réparation³⁴⁴. Ces lésions de l'ADNmt induites par le stress oxydatif provoquent un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire et amplifient davantage la génération de ROS, ce qui favorise les mutations et l'instabilité génétique.

Les cellules normales incapables de réparer complètement les lésions de l'ADN meurent par apoptose afin d'empêcher la transmission de ces mutations aux cellules filles. Cependant, dans le cas de cellules cancéreuses, l'équilibre entre mutations et voies de réparation de l'ADN est modifié ; il en résulte ainsi une accumulation de multiples lésions du génome, favorable au développement tumoral^{344 337}.

En plus de provoquer ces altérations génétiques significatives, les ROS peuvent induire diverses modifications épigénétiques. L'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs suite à une méthylation de la région promotrice représente l'altération épigénétique la plus courante induite par le stress oxydatif, lors de la tumorigenèse. Par exemple, dans les cellules de carcinome hépatocellulaire, l' H_2O_2 régule négativement l'expression de l'E-cadhérine, molécule d'adhésion cellule-cellule et suppresseur de tumeur³⁵³. Cet effet est dû à l'hyperméthylation de la région promotrice de l'E-cadhérine, engendrée par la protéine SNAIL (*Snail Family Transcriptional Repressor 1*) qui recrute l'histone déacétylase 1 (HDAC1) et l'ADN méthyltransférase 1 (DNMT1). La perte d'expression de l'E-cadhérine est associée à un phénotype métastatique et un mauvais pronostic^{339,353}. D'autres gènes suppresseurs de tumeurs, tels que CDKN2A (*cyclin dependent kinase inhibitor 2A*), RUNX3 (*runt related transcription factor 3*), CDX1 (*caudal type homeobox-1*), Rb (Protéine du

rétinoblastome), VHL et BRCA1 (*breast cancer 1*) ont également été identifiés dans des cellules cancéreuses comme étant inactivés après modulation épigénétique dépendante de ROS³³⁹.

2.2.1.2. Dommages protéiques

La modification de résidus d'acides aminés, à l'origine de fonctions altérées, est le principal dommage protéique causé par les ROS. Un stress oxydatif peut également engendrer la carbonylation des protéines, la nitration des résidus tyrosine et phénylalanine, la dégradation de protéines, leur clivage protéolytique ou encore la formation de protéines réticulées et glyquées³³⁷. Les résidus d'acides aminés oxydés influencent la fonctionnalité des protéines, notamment lors des mécanismes de transduction du signal. Par exemple, l'oxydation irréversible des phosphatases au niveau des sites catalytiques entrave leur activité enzymatique. Les altérations oxydatives d'enzymes ont également un impact sur leur efficacité de réparation de l'ADN, la fidélité de l'ADN polymérase pendant la réplication ainsi que sur l'activité transcriptionnelle³³⁷. Enfin, les dommages protéiques en réponse à un stress oxydant peuvent être à l'origine de l'inhibition des GPXs (Glutathion peroxydases) et de la catalase (CAT), altérant l'équilibre d'oxydo-réduction cellulaire.

2.2.1.3. Dommages lipidiques

Enfin, les lipides sont d'autres cibles cellulaires des ROS, qui réagissent avec les acides gras poly-insaturés ou poly-désaturés afin d'initier la peroxydation lipidique. L'oxydation des lipides, en plus de diminuer la fluidité et d'augmenter la perméabilité membranaire³⁴⁴, génère de nombreuses molécules génotoxiques telles que le malondialdéhyde, les 2-alcénals et les 4-hydroxy-2-alcénals pouvant conduire à la mort cellulaire par apoptose³³⁷.

2.2.2. Impact du stress oxydatif sur la signalisation cellulaire

Dans les pathologies tumorales, les voies de transduction du signal sensibles aux ROS sont constamment activées³³⁷. Ainsi, l'action du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ en tant que second messenger de la transduction du signal régule l'activité de protéines de signalisation en oxydant de façon réversible certains résidus cystéine. Cette modification post-traductionnelle provoque un changement conformationnel de ces protéines cibles, suivi soit de leur activation ou de leur inhibition. Les protéines tyrosine phosphatases, tyrosine kinases, les récepteurs tyrosine kinases et des facteurs de transcription peuvent être impactés par ces ROS³³⁷. De cette manière, les espèces réactives de l'oxygène activent les cascades de signalisation MAPK/ERK1/2, PI3K/AKT et IKK/NF-κB et suppriment l'activité de

leurs régulateurs négatifs, tel que PTEN pour la voie AKT. Cette inactivation de PTEN augmente les niveaux basaux de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et de superoxyde $O_2^{\cdot-}$ en raison de la déplétion de l'expression de plusieurs enzymes anti-oxydantes, y compris les peroxyrédoxines (PRDX) et la superoxyde dismutase cuivre/zinc (Cu/ZnSOD) ³³⁷. D'autre part, la plupart des activités tumorigènes des ROS sont générées par la dérégulation des facteurs de transcription, suite à la perturbation de leur liaison à l'ADN ou à leur interaction avec des protéines régulatrices. Par exemple, les facteurs de transcription AP-1 (*activator protein 1*), NF- κ B, p53, HIF-1 α et NRF2 subissent une oxydation inhibitrice par les ROS ³³⁹. Ces voies et facteurs étant impliqués dans diverses fonctions cellulaires, cela explique l'impact des ROS sur la croissance (prolifération et survie cellulaire), la différenciation, le métabolisme énergétique, l'adhésion et la motilité cellulaire, l'angiogenèse, mais aussi le maintien du caractère souche et de l'inflammation ^{337,339}.

2.3. Impact des ROS sur la cancérogénèse

Une signalisation oxydative élevée est impliquée dans la promotion et la progression de différents types de cancers, dont le mélanome, l'hépatome, les leucémies, le gliome et les cancers du sein, du pancréas, de la vessie, du colon, du poumon et de la prostate. De plus, des taux accrus de ROS sont associés à l'initiation et à la progression maligne en impactant la croissance cellulaire, l'angiogénèse *de novo*, le processus de migration/invasion et induisent la résistance aux chimiothérapies ³³⁹, notamment suite à une modulation des mécanismes métaboliques et épigénétiques (**Figure 20**) ³³⁶.

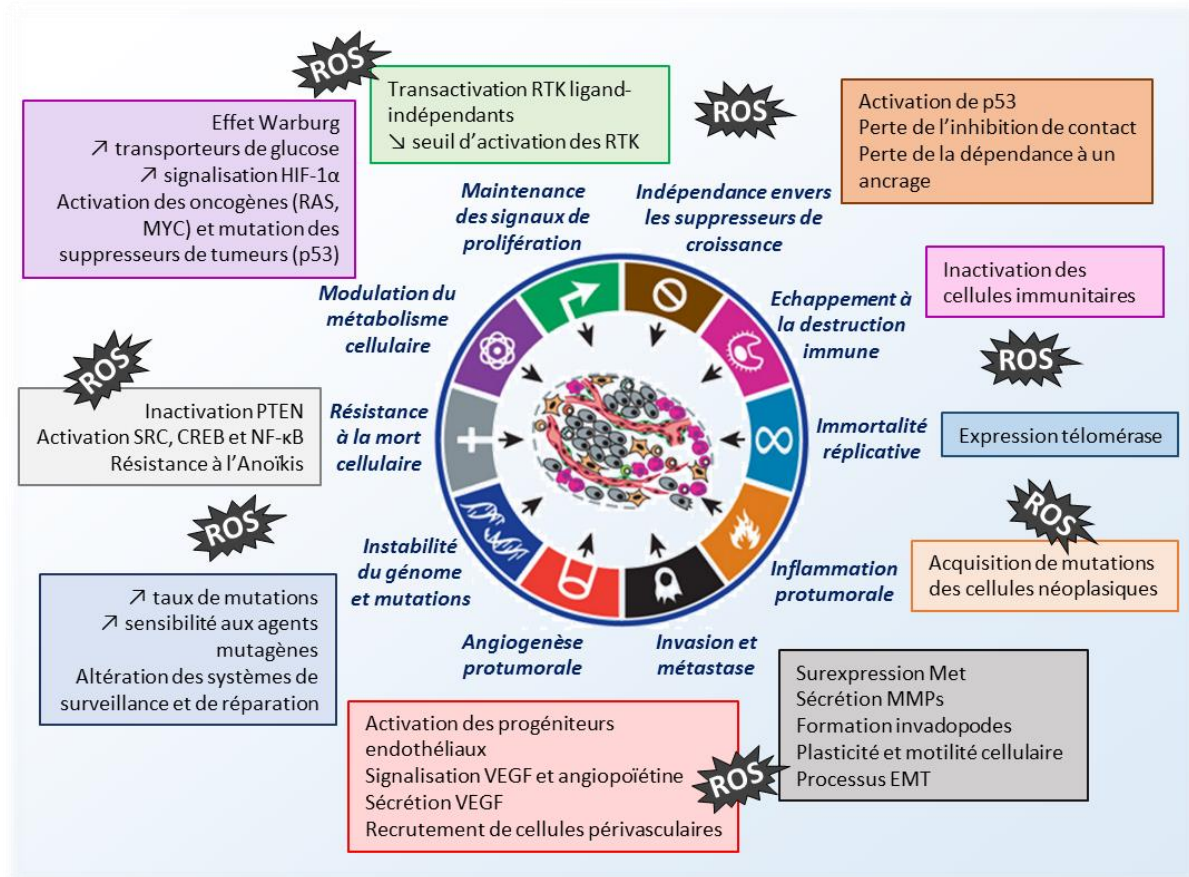


Figure 20: Impact des ROS sur la carcinogénèse.

Les ROS sont impliqués au niveau de tous les processus liés à la progression tumorale, tels que l'évasion aux suppresseurs de croissance, l'échappement à la destruction immune, l'immortalité répllicative, l'inflammation pro-tumorale, l'invasion et métastase, l'angiogenèse pro-tumorale, l'instabilité au niveau du génome et mutations, la résistance à la mort cellulaire, la modulation du métabolisme ainsi que la maintenance des signaux prolifératifs. Inspiré de ³³⁶.

2.3.1. ROS et prolifération cellulaire

De faibles doses de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et de superoxyde $O_2^{\cdot-}$ stimulent la prolifération cellulaire dans une grande variété de cellules cancéreuses ³³⁷.

L'activité de l'enzyme anti-oxydante MnSOD, modulée par les ROS intracellulaires, permet de contrôler la prolifération mais aussi la quiescence cellulaire ³⁵⁴. En effet, la réduction de son activité favorise la prolifération en raison de l'augmentation des niveaux de superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ³⁵⁵. De plus, les espèces réactives de l'oxygène peuvent réguler positivement les niveaux d'ARNm des cyclines B2, D3, E1 et E2, ayant un rôle dans le cycle cellulaire et ainsi accélérer la transition de la phase G1 à la phase S ³⁵⁶. Aussi, la perte du contrôle redox du cycle cellulaire dans les cellules normales de sein MCF-10A contribue à leur prolifération aberrante ³⁵⁷. A l'inverse, les anti-oxydants inhibent la prolifération des cellules tumorales. En effet, les niveaux d'expression et d'activité des

enzymes endogènes MnSOD, Cu/ZnSOD, de la catalase et de la glutathion peroxydase sont inversement corrélés avec les temps de doublement des cellules dans diverses lignées cellulaires de cancer du pancréas ³⁵⁸.

D'autre part, la croissance rapide des cellules tumorales peut être attribuée en partie à une activation exacerbée des récepteurs de facteurs de croissance ainsi qu'aux protéines kinases intracellulaires en aval, comme MAPK/ERK1/2, PI3K/AKT et IKK/NF-κB ³³⁷.

2.3.2. Stress oxydatif et mort cellulaire

Une augmentation disproportionnée des niveaux de ROS intracellulaires peut conduire à l'arrêt du cycle, à la sénescence et l'apoptose des cellules cancéreuses. Un tel taux d'espèces réactives de l'oxygène est induit par des chimiothérapies anti-cancéreuses, par la déplétion de protéines anti-oxydantes ou par leur production par des cellules du micro-environnement, comme les cellules immunes ³³⁷.

2.3.2.1. Stress oxydant et apoptose

Lorsqu'un stress oxydatif accru endommage les composants cellulaires (ADN, protéines et lipides) de manière irréversible, le cytochrome C libéré par les mitochondries entraîne l'activation des caspases et la mort par apoptose ^{359,360}. En réponse aux signaux apoptotiques, la libération de H₂O₂ et de NO par les mitochondries active les kinases JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) qui phosphorylent et régulent négativement les protéines anti-apoptotiques telles que BCL-2 et BCL-xL ¹⁰⁰. D'autres protéines de signalisation sont impliquées dans l'induction de l'apoptose en réponse aux ROS, comme ASK-1 (*apoptosis signal-regulating kinase-1*) capable d'activer les facteurs p38 et JNK, mais aussi FOXO3a (*Forkhead Box O3*), p66Shc (*p66 Src collagen homolog*) et p53 ^{361,362}. Concernant cette dernière, une hypothèse intéressante stipule que le stress oxydatif caractérisant les cellules tumorales peut amener à la sélection de clones cellulaires n'exprimant pas p53 et résistants à l'apoptose ³³⁷. Par ailleurs, les récepteurs de mort tel que le TNFR1 génèrent des ROS mitochondriales, ce qui provoque l'activation des caspases et la mort cellulaire ^{337,363}.

Si des niveaux élevés de ROS conduisent à la mort cellulaire, de faibles niveaux de stress oxydatif peuvent, à l'inverse, favoriser la survie des cellules. En effet, l'élévation des niveaux de ROS mitochondriaux active la protéine kinase PDK1 puis le facteur de transcription NF-κB qui régule positivement les enzymes anti-oxydantes MnSOD et la catalase, ainsi que les protéines anti-apoptotiques A20 et PIAP (*Polyadenylate-binding protein-interacting protein*) ³⁶⁴. Ainsi, la suppression de cette voie sensibilise les cellules tumorales au stress oxydatif et augmente leur susceptibilité à la mort cellulaire par les ROS. La protéine sérine/thréonine

kinase AKT, également activée par les ROS, promeut la survie par phosphorylation et inactivation de ses substrats pro-apoptotiques ^{337,361,365-367}.

2.3.2.2. Stress oxydant et sénescence

Une élévation de la phosphorylation oxydative et de la production de ROS ont été mises en évidence lors de la sénescence induite par activation d'oncogènes, tels que BRAF et RAS ^{368,369}. Cependant, l'instabilité génique et les mutations dues à ces ROS peuvent aussi toucher des gènes clés impliqués dans l'échappement à la sénescence ³⁷⁰.

2.3.2.3. ROS et chimiorésistance / chimiosensibilité

La chimiorésistance est un obstacle majeur à la réussite des traitements du cancer. La famille de protéines ABC (*ATP-binding cassette*), autrement appelées protéines PGP (*P-glycoprotein*), est connue pour être impliquée dans les phénomènes de résistance aux xénobiotiques, en facilitant l'élimination ou l'efflux extracellulaire de ces substances anti-cancéreuses ³⁷¹. Il a été démontré que les ROS sur-activent l'expression des PGP dans des cellules d'hépatome ³⁷². Toutefois, plusieurs études controversées ont montré une diminution de l'expression des Pgp lorsque les concentrations de ROS sont élevées ³³⁹. En effet, à faible concentration d'H₂O₂, l'expression des PGP est accrue dans des cellules colorectales cancéreuses Caco-2, alors que des concentrations plus élevées la réduisent ³⁷³. A l'inverse, la catalase, protéine anti-oxydante, favorise l'expression des PGP dans les cellules HepG2 ³⁷⁴.

En résumé, les ROS sont impliquées aussi bien dans la chimiorésistance que dans la chimiosensibilisation. Cependant, des études plus détaillées sont nécessaires afin d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans cette régulation des protéines PGP ³³⁹.

2.3.3. ROS, processus d'invasion et de métastase

Un nombre croissant d'études suggère que les ROS, en particulier l'H₂O₂, participent activement aux processus d'invasion et de formation de métastases ^{339,375}.

Par exemple, une augmentation subtile de l'état d'équilibre des taux d'H₂O₂ intracellulaires est suffisante et indispensable pour contrôler la signalisation pro-migratoire des cellules cancéreuses de vessie ³⁷⁶. Le radical [•]OH serait également lié à l'invasion et aux métastases de cellules cancéreuses pulmonaires ³³⁷. De plus, les cellules de cancer du sein ou du pancréas métastatiques et hautement invasives, présentent des niveaux et activités atténués de l'enzyme anti-oxydante MnSOD ^{337,377,378}. Ces données illustrent le rôle déterminant de l'état d'oxydo-réduction intracellulaire dans la régulation du processus métastatique.

Les facteurs de croissance endogènes et les cytokines jouent un rôle crucial dans le caractère invasif des cellules tumorales ³³⁷. Des facteurs de croissance tels que le VEGF, le PDGF, l'HGF, ainsi que des cytokines comme le TNF- α provoquent l'invasion des cellules cancéreuses suite à la génération de ROS par les NOX ou la chaîne mitochondriale de transport d'électrons ^{375,379-381}. Cette production de ROS est également déclenchée après activation des intégrines, récepteurs d'adhérence cellulaire impliqués dans l'invasion ³⁸².

Fait intéressant, la génération de ROS peut à son tour influencer l'activation des facteurs de croissance et des intégrines, suggérant l'existence d'une boucle de rétro-action positive ^{339,375,383,384}. Ces ROS favorisent la migration des cellules malignes en modulant diverses kinases telles que MAPK, PI3K/AKT, PKC et FAK (*Focal Adhesion Kinase*) ³³⁹.

Un autre mécanisme possible par lequel les ROS participent à la migration cellulaire est la modulation du cytosquelette d'actine. La génération de ROS et notamment d'H₂O₂, active les protéines SSH1L (*Slingshot 1L*) suivies de la cofiline, protéine de liaison à l'actine qui régule le remodelage du cytosquelette et facilite la migration ^{337,375}. L'inhibition de la production de ROS après traitement à la NAC (N-acétylcystéine) inactive la cofiline et empêche ainsi la migration cellulaire ³⁸⁵. En outre, les ROS peuvent directement oxyder la β -actine, conduisant au désassemblage du complexe actine-myosine lors de la motilité cellulaire ³³⁹.

Enfin, les ROS induisent l'invasion des cellules tumorales et la formation de métastases en provoquant la dégradation protéolytique des glycosaminoglycanes et autres composants de la matrice extracellulaire ³³⁹. Cela est possible notamment par l'activation des enzymes métalloprotéinases matricielles, par exemple la MMP2 dans des cellules de mélanome, leur conférant un phénotype invasif ³⁸⁶.

2.3.4. Stress oxydatif et reprogrammation métabolique

2.3.4.1. ROS et dérégulations métaboliques

Les espèces réactives de l'oxygène ont des effets pléiotropes sur les processus cellulaires, dont le métabolisme ³⁸⁷. Celui-ci est reprogrammé après un stress oxydatif pour augmenter la synthèse de diverses biomolécules, afin de remplacer les composants cellulaires endommagés. Des changements de l'état d'oxydo-réduction cellulaire peuvent modifier l'état d'oxydation des enzymes métaboliques et entraîner une modulation de leur activité. A titre d'exemple, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) est l'une des protéines les plus oxydées en réponse au peroxyde d'hydrogène ³⁸⁸. Un état élevé d'oxydation de cette molécule est requis pour rediriger les intermédiaires métaboliques dans la voie des pentoses phosphates et faciliter la génération de NADPH, nécessaire pour l'adaptation des cellules à un stress oxydatif ³⁸⁹. De manière intéressante, la GAPDH oxydée

interagit avec les protéines liant l'ARN et l'ADN, suggérant que ces mécanismes d'adaptation ne se limitent pas à des altérations de l'activité enzymatique ^{387,390}.

L'accumulation d'intermédiaires glycolytiques suite à un stress oxydant peut aussi être la conséquence de l'inhibition de la pyruvate kinase M2 par les ROS, qui augmente le flux à travers la voie PPP ³⁹¹. PKM2 contrôle également le flux dans la voie de biosynthèse de la sérine ³⁹², soutenant ainsi la production de glutathion ^{387,393,394}.

La fructose-2,6-bisphosphatase (Fru-2,6-BP) autrement appelée TIGAR et dont l'expression est induite par les ROS, joue également un rôle clé dans la modulation du métabolisme en réponse au stress oxydatif ³⁹⁵. En effet, cette protéine régule les niveaux intracellulaires de Fru-2,6-BP et donc l'activité de PFK1. L'inhibition de cette dernière détourne les métabolites dans la voie PPP, augmentant de ce fait la production de NADPH et la réponse anti-oxydante ³⁹⁶⁻³⁹⁹. TIGAR peut aussi se lier à l'hexokinase 2 et favoriser son activité au niveau des mitochondries pendant l'hypoxie, limitant la production de ROS ⁴⁰⁰. Ainsi, la régulation de l'activité enzymatique glycolytique par les ROS soutient la réponse anti-oxydante ³⁸⁷.

Enfin, l'oxydation des enzymes du cycle TCA, de la chaîne de transport d'électrons (ETC) et de la voie de la β -oxydation se produit après un stress oxydatif, de manière réversible ou irréversible. La S-glutathionylation (par formation de ponts disulfure), réaction d'oxydation réversible et temporaire, protège les enzymes du cycle TCA, de l'ETC ou de la β -oxydation contre une oxydation irréversible due à un niveau élevé de ROS. Elle peut aussi diminuer la production de ROS par la mitochondrie en réduisant son activité ⁴⁰¹.

2.3.4.2. ROS et hypoxie

Au sein d'une masse tumorale croissante, les cellules cancéreuses font face à des cycles d'hypoxie et de réoxygénation ^{337,402,403}. Un état d'hypoxie prolongé pouvant entraîner la mort, les cellules malignes modulent leur métabolisme vers un phénotype « Warburg » afin de s'adapter aux conditions d'anoxie et permettre la progression tumorale ^{337,404}.

L'hypoxie engendre l'expression de plusieurs facteurs de transcription, dont HIF-1.

Lors de conditions pauvres en oxygène, l'enzyme anti-oxydante MnSOD supprime l'induction de HIF-1 α dans les cellules de carcinome mammaire, alors que l'anion superoxyde O₂⁻ et l'augmentation de la production d'H₂O₂ contribuent à son accumulation ³⁵⁵. Ces données suggèrent par ailleurs que plusieurs types de ROS sont impliqués dans la réponse à l'hypoxie ^{337,355}.

Les ROS sont capables d'induire et de stabiliser HIF-1 α de différentes manières, par exemple en activant la voie PI3K/AKT après inhibition de PTEN, par oxydation de résidus cystéine ⁴⁰⁵. La sur-activation d'AKT, facteur majeur associé à l'augmentation de la glycolyse des cellules cancéreuses ⁴⁰⁶, influe sur l'activité de la protéine mTOR et rend fonctionnel le

facteur HIF-1. Celui-ci est à l'origine de la transcription de gènes codant les transporteurs du glucose et des enzymes de la glycolyse ; il empêche également l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie, inhibant ainsi la phosphorylation oxydative³¹⁰. D'autre part, les ROS stabilisent HIF-1 α suite à une surproduction mitochondriale de peroxyde d'hydrogène H₂O₂^{52,405,148}. Il est intéressant de noter que les mitochondries augmentent leur production de ROS en réponse à l'hypoxie. En effet, une commutation entre deux sous-unités du complexe IV de la CRM se produit, donnant lieu à une meilleure efficacité de la respiration mitochondriale et de ce fait, à la production de radicaux superoxydes par le complexe III⁴⁰⁸. Présente dans les mitochondries, la MnSOD convertit ces radicaux O₂⁻ en H₂O₂ qui s'accumule dans le cytosol et permet la stabilisation d'HIF-1 α en inhibant l'activité de la protéine PHD. L'augmentation de l'expression de HIF-1 α est corrélée à un mauvais pronostic et à une invasivité accrue des cellules cancéreuses³³⁷.

Outre leur impact sur le facteur de transcription HIF-1, les ROS ont la capacité d'oxyder directement des protéines clés de la glycolyse, comme PKM2. Lorsque les niveaux de ROS sont élevés, cette dernière est inactivée ; il en résulte une redirection des métabolites de la glycolyse vers la voie des pentoses phosphates, à l'origine de la biosynthèse de macromolécules et de la génération de NADPH, puissant facteur anti-oxydant³⁵².

Lors de la croissance tumorale, de nombreuses néo-vasculatures sont développées pour faciliter l'apport d'oxygène et de nutriments au centre de la tumeur ; on parle d'angiogénèse tumorale. La prolifération des cellules endothéliales, la migration et la formation de tubes sont trois des événements clés de ce processus^{339,409}. Plusieurs études suggèrent un rôle des ROS dans l'organisation de ces événements. Les conditions hypoxiques stimulent le développement des vaisseaux sanguins, de sorte que le flux sanguin dans ces nouveaux vaisseaux, souvent chaotique, provoque un stress oxydatif par le biais de périodes d'hypoxie et de réoxygénation³³⁷. Les ROS régulent la signalisation du facteur pro-angiogénique VEGF de plusieurs manières. Ainsi, ces ROS induisent l'expression du VEGF et de son récepteur VEGFR suite à la stabilisation de HIF-1 α ^{384,410}, mais engendrent aussi l'activation de ce récepteur en modulant les voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK^{339,411}. La suppression des ROS endogènes après traitement par des inhibiteurs de l'activité mitochondriale ou de la glutathion peroxydase diminue l'induction de HIF-1 et l'expression de VEGF dans les cellules cancéreuses³³⁷.

D'autre part, la génération d'H₂O₂ par NOX4 entraîne la prolifération des cellules endothéliales, alors que NOX4 promeut leur survie en prévenant l'apoptose³³⁹. Enfin, les ROS régulent divers facteurs de transcription et gènes impliqués dans ce phénomène d'angiogénèse, tels que REF-1 (*redox factor-1*), NF- κ B, p54, COX-2 et les MMPs³³⁹.

2.4. Différentes réponses anti-oxydantes

Puisque les ROS sont liées à de nombreux processus biologiques et pathologiques, l'équilibre redox entre la production d'espèces réactives de l'oxygène et le phénomène de détoxification est crucial. Les systèmes anti-oxydants agissent selon trois axes : empêcher les ROS de réagir ensemble, transformer les oxydants en espèces moins toxiques et prévenir ou réparer les lésions oxydatives induites. Ces processus peuvent être enzymatiques et impliquer les enzymes SOD, la catalase, les peroxyrédoxines PRDX aussi connues sous le nom de thioredoxine peroxydase, et le système glutathion peroxydase GPX. Les vitamines A, C (acide ascorbique) et E (α -tocopherol), les flavonoïdes et caroténoïdes mais aussi des oligo-éléments tels que le sélénium, le cuivre et le zinc possèdent également des fonctions anti-oxydantes ³³⁹.

Les superoxydes dismutases (SOD) catalysent la dismutation de l'anion superoxyde mitochondrial $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 , capable de diffuser dans le cytosol pour être réduit en H_2O par le système PRX, le système GPX ou la catalase (**Figure 21**). Nous allons décrire ci-dessous les différents processus enzymatiques anti-oxydants.

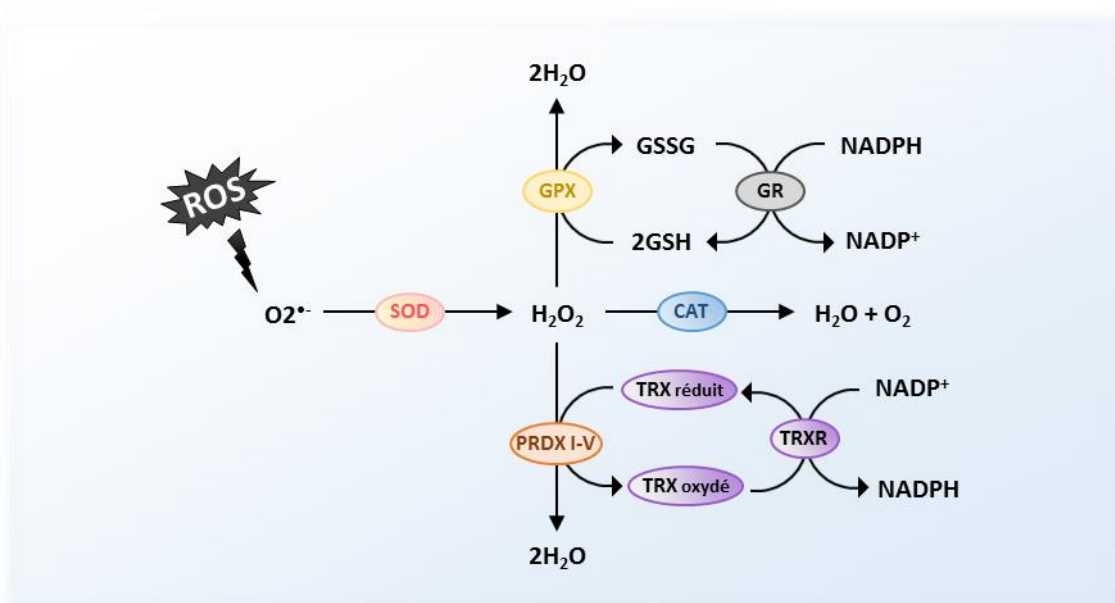


Figure 21: Principaux systèmes anti-oxydants.

La dismutation de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 est catalysée par les enzymes dismutases (SOD). Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 peut ensuite être réduit en H_2O de trois manières : 1) par l'enzyme catalase, 2) par le système PRDX ou 3) par le système GPX.

2.4.1. La catalase

La catalase est une hémoprotéine possédant quatre groupements hème qui facilite la dismutation du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en eau et inhibe la formation de radicaux libres tel que le radical hydroxyle ⁴¹². Cette enzyme ubiquitaire, retrouvée majoritairement dans le cytosol et les peroxysomes, est sur-exprimée dans divers cancers ⁴¹³.

2.4.2. Les superoxyde dismutases (SOD)

Les superoxyde dismutases SOD utilisent des ions métalliques tels que le cuivre (Cu^{2+}), le zinc (Zn^{2+}), le manganèse (Mn^{2+}) ou le fer (Fe^{2+}) comme cofacteurs afin de catalyser la dismutation de $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 ⁴¹². Elles sont ainsi classées en trois groupes : Cuivre/Zinc (CuZn)-SOD cytoplasmique (SOD1), Manganèse (Mn)-SOD (SOD2) mitochondriale et CuZn-SOD (EC-SOD ou SOD3) extracellulaire ^{337,339}.

2.4.3. Le système peroxyrédoxine (PRDX)

Les peroxyrédoxines (Prdx) sont des peroxydases de thioredoxine qui catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , du peroxyde d'azote ($ONOO^{\cdot-}$) et des hydroperoxydes organiques (composés contenant les anions $HOO^{\cdot-}$) ³³⁷.

Le système des PRDX se compose de deux donneurs d'électrons et de deux types d'enzymes anti-oxydantes: les PRX I-VI, la thioredoxine réductase (TRXR), la thioredoxine (TRX) et le NADPH. Au cours de la réduction de H_2O_2 , le PRX s'oxyde et est inactivé. La TRX agit comme un donneur d'électrons immédiat et réduit le PRX en sa forme active. La TRX est ensuite réduite par la TRXR ayant reçu ses électrons du NADPH ³³⁹.

2.4.4. Le système glutathion (GPX)

Le système glutathion comprend le glutathion (GSH), la glutathion réductase (GR), les glutathion peroxydases (GPX) et les glutathion S-transférases (GST) ³³⁹.

Le glutathion est synthétisé par les cellules lors de la glycolyse, de la β -oxydation et du métabolisme de la glutamine. Ce tripeptide, formé d'acide glutamique, de cystéine et de glycine, est retrouvé sous forme réduite GSH ou oxydé GSSG. Le couple GSH/GSSG est un cofacteur des GPX et est capable de fixer les métaux lourds (cadmium, mercure, plomb) toxiques et pourvoyeurs de ROS. Aussi, cet anti-oxydant majeur protège les cellules du stress oxydatif en réduisant les ponts disulfure au niveau des cystéines de protéines cytoplasmiques. Le GSH est donc essentiel au maintien de l'équilibre redox.

Au cours du processus de détoxication, le glutathion GSH est oxydé en disulfure de glutathion (GSSG) par les GPX, ce qui permet la transformation du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et des hydroperoxydes organiques en H_2O ³³⁷. La glutathion réductase GR utilise ensuite le NADPH pour réduire le GSSG et rétablir les stocks de GSH ³⁵². Ce système de détoxication est sur-activé dans de multiples types tumoraux par rapport aux tissus normaux et participe donc à la résistance des cellules malignes à un stress oxydatif accru ³³⁷. De plus, dans des conditions physiologiques, le glutathion existe presque exclusivement sous sa forme réduite GSH en raison d'une activité constitutive de la glutathion réductase GR dans les cellules ³³⁷. Les Glutathion S-transférases GST sont des enzymes de détoxication qui catalysent la transformation du GSH en une variété de composés électrophiles exogènes et endogènes ⁴¹⁴. Elles sont sur-exprimées dans une grande variété de tumeurs pour réguler les voies MAPK et sont impliquées dans le développement de la résistance aux agents chimio-thérapeutiques ^{337,414}.

Dans certaines cellules cancéreuses, un cycle redox futile entraîne une consommation excessive de NADPH. Celui-ci étant nécessaire pour le maintien de l'équilibre d'oxydo-réduction cellulaire, des capacités limitées à maintenir un pool suffisant de NADPH peuvent être à l'origine d'un état chronique de stress oxydatif ⁴¹⁵. En effet, le cofacteur NADPH fournit un pouvoir réducteur dans de nombreuses réactions enzymatiques cruciales pour la biosynthèse de macromolécules. Il est également un agent anti-oxydant majeur, détoxifiant les cellules tumorales des ROS produites au cours de leur prolifération incontrôlée. Le NADPH confère ses pouvoirs réducteurs aux systèmes de glutathion GSH et de thioredoxine TRX, qui capturent les ROS et réparent les dommages induits ³¹⁰.

Ce cofacteur est produit par les cellules tumorales lors de la mise en jeu de plusieurs voies métaboliques. Une des sources importantes de NADPH dans le cytosol est la voie des pentoses phosphates, qui génère le NADPH à partir de l'oxydation du G-6-P par la glucose-6-phosphate déshydrogénase. Cette voie détourne le flux glycolytique vers la synthèse des purines et la génération de NADPH ²⁶². Il existe d'autres sources de génération de ce cofacteur, notamment la mitochondrie, lors du métabolisme de la glutamine et de l'utilisation des acides gras. Ainsi, le NADPH est produit par l'enzyme malique lors de la β -oxydation des acides gras, par les enzymes IDH1 et IDH2 lors de la transformation de l'isocitrate en α -kétoglutarate, mais aussi au cours de la glutaminolyse lors de laquelle le malate est exporté dans le cytosol afin de fournir du pyruvate et du NADPH ^{262,416}. Enfin, le NADPH peut dériver du métabolisme du folate, impliqué dans la synthèse des bases nucléiques (purines et pyrimidines) ⁴¹⁵.

La reprogrammation du métabolisme des cellules cancéreuses favorise donc un état prolifératif, la survie, mais aussi la protection de ces cellules contre un stress oxydatif pouvant s'avérer létal.

Les cellules tumorales peuvent également activer des voies de signalisation suite à un stress oxydant, comme la voie NRF2/KEAP1. Cette voie possède un rôle essentiel dans la détection de molécules électrophiles génératrices de stress oxydatif, et protège donc les cellules cancéreuses.

PARTIE 3 : La voie de signalisation NRF2-KEAP1

1. Le facteur de transcription NRF2

Le facteur de transcription NRF2 (*Nuclear Factor erythroid-2-Related Factor 2*) possède un rôle essentiel dans la défense cellulaire à l'encontre des stress oxydants et électrophiles. Il régule les voies de détoxification en se fixant au niveau des séquences ADN « *Antioxidant Response Element* » (ARE) présentes au niveau des promoteurs de ses gènes cibles codant des enzymes anti-oxydantes et enzymes de phase II. Ce facteur appartient à la famille protéique *Cap 'n' Collar* (CNC) ⁴¹⁷⁻⁴²⁰. Celle-ci comporte également les molécules NRF1 et NRF3, ainsi que les facteurs BACH1 et BACH2 [*BTB (Broad complex Tramtrack and Bric-a-Brac) and CNC Homolog*]. Tout comme NRF2, NRF1 induit la transcription de gènes possédant une séquence ARE, même si son activité transcriptionnelle est plus faible ⁴²¹. A l'inverse, les protéines NRF3, BACH1 et BACH2 régulent négativement l'expression de ces gènes cibles ⁴²².

L'expression de NRF2 est ubiquitaire et retrouvée dans de nombreux organes détoxifiants comme le foie, les reins, la peau, les poumons, le tube digestif ou encore les muscles ^{417-420,423}.

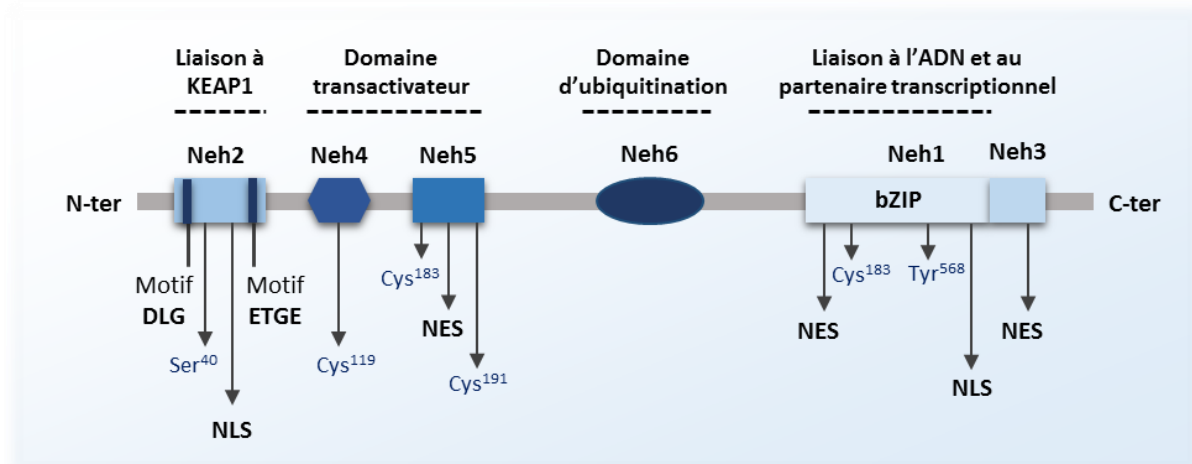


Figure 22: Structure et domaines fonctionnels de la protéine NRF2.

Les résidus cystéiniques réactifs ainsi que les domaines d'import et export nucléaire sont indiqués. Adapté de Magesh et al., 2012 ⁴²⁴. bZIP : domaine leucine zipper basique ; NLS : nuclear localization signal ; NES : nuclear export signal.

Composée de 605 acides aminés chez l'Homme ⁴²⁵, cette protéine est divisée en six domaines fonctionnels appelés Neh 1 à 6 (*NRF2 ECH homology*) et possède une région basique leucine zipper (bZIP) en C-terminal (**Figure 22**) ⁴²⁴. Au niveau de cette région se

située Neh1, domaine de liaison à l'ADN (sur les séquences ARE) et de dimérisation avec d'autres facteurs de transcription de la famille bZIP, dont les protéines MAFK, MAFK et MAFF (*Musculo-Aponeurotic Fibrosarcoma*) ou JUN (c-JUN, JUN-D et JUN-B). Cette dimérisation est nécessaire pour l'activité transcriptionnelle de NRF2⁴²⁵. La région Neh2 située au niveau de l'extrémité N-terminale contient des degrons, portions responsables de la dégradation protéasomale de la protéine et correspondant aux motifs spécifiques DIDLID (acides aminés 17 à 32), DLG (aa29-aa31) et ETGE (aa79-aa82). En effet, si le motif DIDLID engendre le recrutement de l'enzyme ubiquitine ligase, DLG et ETGE induisent l'interaction de NRF2 avec le domaine Kelch de la protéine KEAP1, inhibiteur endogène de NRF2 provoquant sa dégradation à l'état basal⁴²⁴. La région Neh6 est également marquée par la présence de deux degrons (aa329-aa339 et aa363-aa379), contrôlant la dégradation nucléaire de NRF2 par l'ubiquitine ligase E3 lors d'un stress oxydatif⁴²⁵. Enfin, les régions Neh3 (en C-terminal), Neh4 et Neh5 (en N-terminal) sont nécessaires à l'activation transcriptionnelle de NRF2⁴²⁴. Il est intéressant de noter que des séquences NLS (*Nuclear Localization Sequence*) permettant la translocation nucléaire de NRF2 sont retrouvées au niveau des régions Neh1, Neh2 et Neh3, alors que les séquences NES (*Nuclear Export Sequence*) sont présentes au sein de Neh1 et Neh5^{423,424}.

2. KEAP1, senseur et inhibiteur naturel de NRF2

2.1. Structure moléculaire de KEAP1

KEAP1, la protéine inhibitrice de NRF2, est à l'origine de l'ubiquitination et de la dégradation de ce facteur de transcription par le protéasome 26S. Constituée de 624 acides aminés et riche en cystéines (27 chez l'Homme), KEAP1 est un senseur de l'état redox cellulaire : ses résidus cystéines s'oxydent suite à une production élevée de ROS ou de molécules électrophiles. Cette oxydation modifie la conformation du complexe protéique NRF2-KEAP1 et de ce fait, l'interaction entre ces deux protagonistes, favorisant ainsi la stabilisation de NRF2⁴²⁶.

Structurellement, KEAP1 possède cinq domaines fonctionnels que sont la région N-terminale, le domaine de dimérisation BTB (*Broad complex Tramtrack and Bric-a-Brac*), les régions IVR (*InterVening Region*), DGR (*Double Glycine Repeat/Kelch*) et C-terminale^{417-420,424} (**Figure 23**). Le domaine BTB permet l'homodimérisation et l'interaction de KEAP1 avec le complexe CUL3/RBX1 (*Cullin3/ring box1*) E3 ubiquitine ligase. Ce dernier est donc responsable de l'ubiquitination et de la dégradation du facteur NRF2. Les domaines DGR et C-terminal forment la région KEAP1-DC, contenant 6 séquences Kelch répétées (KR1-KR6)

interagissant avec le domaine Neh2 de NRF2 ⁴²⁴. La région IVR, possédant des séquences NES, est riche en cystéines et sensible aux réactions d'oxydation.

A ce jour, sept cystéines ont été décrites comme étant importantes pour l'activité de KEAP1 : Cys151, Cys257, Cys273, Cys288, Cys297, Cys434 et Cys613 ⁴²⁴. La cystéine Cys151, localisée au niveau du domaine BTB, est essentielle pour le recrutement du complexe d'ubiquitination et de dimérisation de KEAP1, mais aussi pour la stabilisation de NRF2 en présence d'inducteurs tels que le sulforaphane et le t-BHQ (tert-Butylhydroquinone) ^{427,428}. Enfin, les cystéines Cys273 et Cys288, présentes dans le domaine IVR, sont nécessaires pour la fixation de KEAP1 à NRF2 ⁴¹⁷⁻⁴²⁰.

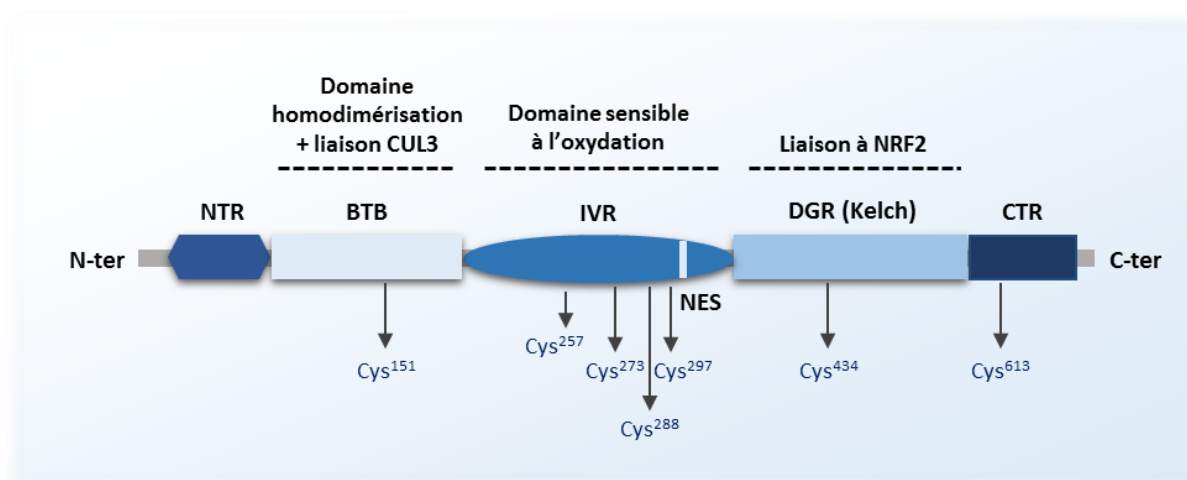


Figure 23: Structure et domaines fonctionnels de KEAP1.

Les résidus cystéines réactifs et le domaine NES sont indiqués. Adapté de Magesh et al., 2012 ⁴²⁴.

2.2. Mécanisme d'interaction NRF2-KEAP1

Localisée dans le cytoplasme, la protéine KEAP1 régule négativement le facteur de transcription NRF2 en induisant sa dégradation par le protéasome 26S. Des études biochimiques et structurales ont été réalisées afin de déterminer les mécanismes d'interaction entre ces deux molécules ⁴²⁶. A l'état basal, les motifs DLG et ETGE du domaine Neh2 de NRF2 se lient à la région DGR/Kelch de l'homodimère de KEAP1. Ainsi, les cystéines du domaine IVR sont exposées à l'extérieur de ce complexe et peuvent, de ce fait, détecter un potentiel stress redox cellulaire ⁴²⁶. En outre, lors d'un stress oxydatif, les ROS produites réagissent avec les résidus cystéines de la protéine KEAP1. Elles engendrent une modification conformationnelle et l'absence de recrutement du complexe d'ubiquitination de NRF2, entraînant sa stabilisation (**Figure 24**) ⁴²⁹.

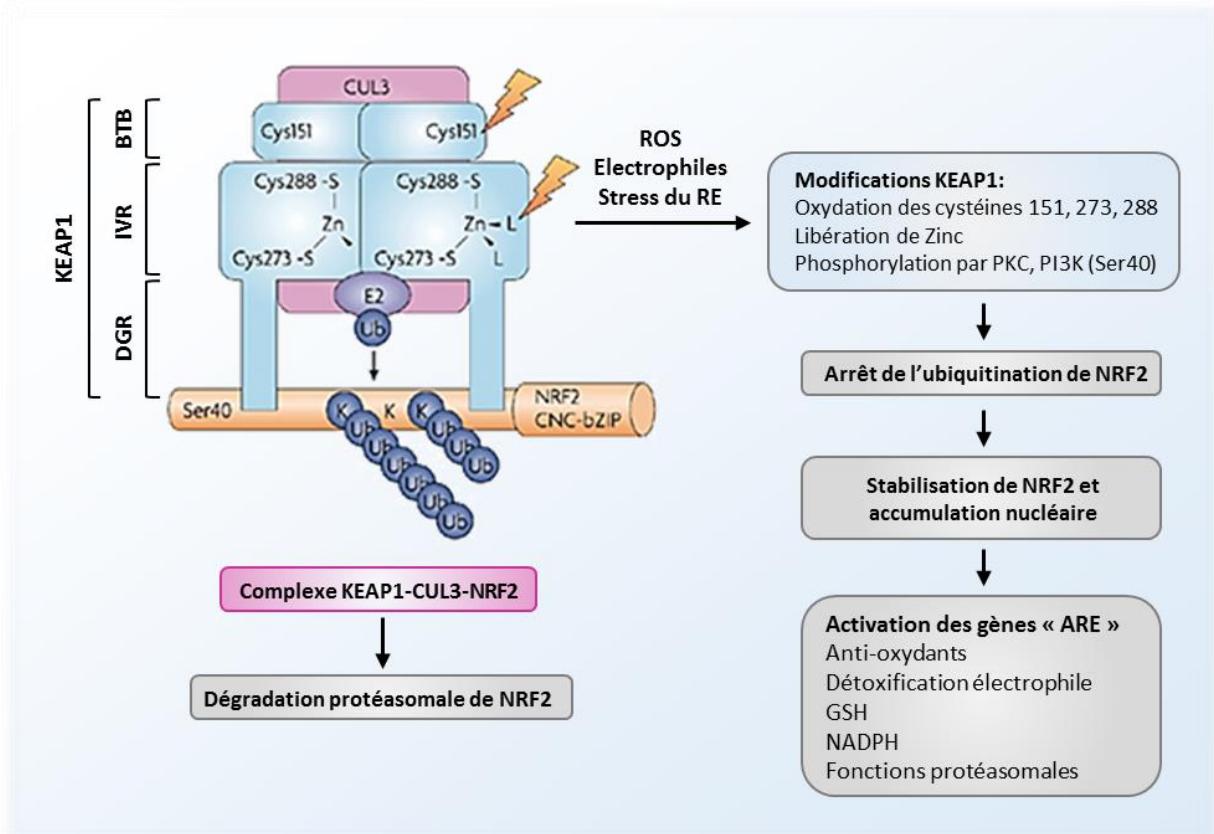


Figure 24: Schéma du modèle d'interaction entre les sites de KEAP1 et NRF2.

Le complexe KEAP1-CUL3 interagit avec le facteur NRF2 afin d'induire sa dégradation protéasomale suite à l'addition d'ubiquitine au niveau d'un résidu Lys situé dans sa région N-terminale. Lors d'un stress oxydatif ou électrophile, des résidus Cys de KEAP1 sont modifiés, conduisant à la libération de Zinc et une modification conformationnelle ne permettant plus l'ubiquitination de NRF2. Celui-ci est ainsi stabilisé puis son accumulation nucléaire permet l'activation de la transcription de ses gènes cibles portant une séquence « ARE » (Antioxydant response element). D'après D'Autreaux and Toledano, 2010 ⁴²⁶.

3. Séquences Antioxydant Response Element « ARE » et gènes cibles de NRF2

3.1. Les séquences Antioxydant Response Element

En 1991, des séquences ARE ont été identifiées suite à des analyses, chez le rat, de promoteurs de gènes codants deux enzymes de détoxification de phase II que sont Gst2a (sous-unité 2a de la *glutathion-s-transférase*) et Nqo1 (*nadph-quinone oxydoréductase 1*) ⁴³⁰. Ces séquences nucléotidiques spécifiques et situées au niveau des promoteurs des gènes cibles de NRF2 sont décrites comme tel : 5'-TGA(C/T)nnnGCA-3' ('n' indique n'importe quelle base) ^{430,431}. De manière intéressante, la région promotrice de NRF2 possède des AREs, permettant sa propre transcription ⁴³².

Les AREs ont des similitudes avec d'autres séquences d'ADN telles que les TRE [TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) Response Element] ciblées par le facteur de transcription AP-1, ou les MARE (*Maf Recognition Element*) reconnues par les protéines MAFs. En raison de ces homologies séquentielles, les AREs peuvent être ciblées par plusieurs hétérodimères, ce qui conduit à l'activation ou l'inhibition de la transcription de ces gènes. Par exemple, des hétérodimères NRF2/facteur bZIP ont été décrits comme activateurs transcriptionnels. Ce facteur bZIP peut correspondre à une protéine JUN (c-JUN, JUN-D et JUN-B)⁴³³, ATF-4⁴³⁴ ou une protéine MAF (MAFG, MAFF ou MAFK). L'affinité de fixation de la molécule NRF2 sur ses séquences cibles dépend du facteur bZIP auquel elle est associée⁴³⁵. En absence de stress oxydatif, la fixation au niveau des séquences ARE d'homodimères de MAFs ou d'hétérodimères MAF/autre protéine, telle que BACH1, inhibe la transcription de ces gènes cibles anti-oxydants et régule l'activation de NRF2⁴³⁵.

3.2. Gènes cibles de NRF2

Les gènes régulés par NRF2 possèdent tous des séquences ARE au niveau de leurs promoteurs. Ils ont tout d'abord été mis en évidence en utilisant des modèles de souris déficientes pour le gène codant *Nrf2*, puis par études de *microarrays*. Ainsi, plusieurs catégories de gènes régulés par NRF2 ont été caractérisées, comme les gènes anti-oxydants régulant l'équilibre redox, les gènes codant les enzymes de détoxification de phase II ou d'autres gènes tels que ceux codant les transporteurs ABC.

3.2.1. Les enzymes de l'équilibre redox

Les enzymes de l'équilibre redox, impliquées dans le maintien du niveau intracellulaire en glutathion et dans l'élimination des ROS, sont régulées par le facteur de transcription NRF2. Parmi ces enzymes, se trouvent la Superoxyde dismutase (SOD), la Catalase (CAT), la Glutathion Péroxydase (GPX) et la Thioredoxine (TRX), évoquées précédemment (**Introduction, Partie 2, chapitre 2.4**). Effectivement, il a été montré que l'activité SOD et l'expression génique de la CAT sont respectivement diminuées dans des fibroblastes cardiaques et cellules hépatiques issus de souris *Nrf2*^{-/-}, par rapport aux cellules *Nrf2*^{+/+}^{436,437}. De plus, l'exposition de souris *Nrf2*^{+/+} à la fumée de cigarette induit une forte élévation de l'expression de *Gpx2* par rapport aux souris non exposées ou *Nrf2*^{-/-}⁴³⁸. De même, *Nrf2* a la capacité de réguler les enzymes Prx, Trx et les Trxr. L'expression des protéines Trx et Trxr est réduite dans les cellules murines rétinales 661W *Nrf2*^{-/-} par rapport aux cellules contrôles, après traitement pro-oxydant par le 4-hydroxynonanal (4-HNE ; aldéhyde réactif produit lors de la peroxydation lipidique)⁴³⁹. Quant à la Prx1, une expression

génique basale est retrouvée dans les fibroblastes embryonnaires murins (MEF) *Nrf2*^{+/+} alors qu'elle est inexistante dans les MEF *Nrf2*^{-/-} 440.

La Glutamate Cystéine Ligase (GCL), la Hème Oxygénase-1 (HMOX1) et la Ferritine, autres enzymes de l'équilibre redox, sont également régulées par NRF2.

La **Glutamate Cystéine Ligase** (GCL), autrement appelée Glutamylcystéine Synthétase (GCS), possède deux sous-unités : une régulatrice, la GCLM (*GCL Modifier*), et une catalytique, la GCLC (*GCL Catalytic*). Cette enzyme a la capacité de catalyser la synthèse du GSH par la formation de Y-glutamyl cystéine à partir de glutamate et de cystéine, en présence d'ATP 441. La GSH synthase permet ensuite l'ajout de glycine au niveau du dipeptide Y-glutamyl cystéine, afin d'obtenir du glutathion GSH 441. En 2009, le groupe de MacLeod a mis en évidence une augmentation de l'expression des protéines GCLC et GCLM suite au traitement de kératinocytes humains (HaCaT) par un activateur de NRF2, le sulforaphane 442.

La **Hème Oxygénase-1** (HMOX1), aussi nommée *Heat Shock Protein 32* (Hsp32), provoque la dégradation de l'hème en monoxyde de carbone (CO), fer et biliverdine. Celle-ci est ensuite transformée par la biliverdine réductase (BVR) en bilirubine 443. De nombreuses études ont montré que des agents anti-oxydants activateurs de NRF2 favorisent l'expression de HMOX1. Par exemple, l'homocystéine, le diéthyl maléate (DEM), le zerumbone et le cinnamaldéhyde induisent respectivement l'expression de HMOX1 dans des cellules HepG2, des macrophages péritonéaux, des cellules épidermales murines et dans la lignée leucémique THP-1 444-447.

Enfin, la **Ferritine** est une protéine ubiquitaire jouant un rôle important dans le métabolisme du fer lors d'un stress oxydant. Ainsi, cette enzyme séquestre le fer dans le cytoplasme et empêche la formation de radicaux libres tels que l' HO^{\cdot} 448. Dans des kératinocytes humains, son expression est induite par NRF2 suite à un traitement à l'arsenic 449. De même, le traitement de fibroblastes murins *Nrf2*^{+/+} par l'oltipraz ou le 1,2-dithiole-3-thione (D3T), agents activateurs de *Nrf2*, engendre une élévation de l'expression de la ferritine, contrairement aux cellules *Nrf2*^{-/-} 450.

3.2.2. Les enzymes de détoxification de phase II

Les enzymes de détoxification de phase II, régulées par le facteur de transcription NRF2, assurent le maintien de l'homéostasie cellulaire. En effet, ces protéines anti-oxydantes protègent les cellules contre les métabolites réactifs formés suite à un stress oxydant ou électrophile, en catalysant des réactions de conjugaison permettant d'augmenter la solubilité et l'élimination des toxiques 417-420. Elles peuvent être classées en deux

catégories : 1) les enzymes de conjugaison comme les glutathion-S-transférases GST et les uridine diphospho (UDP)-glucuronosyltransférase (UGT) ; 2) les enzymes impliquées dans la réduction des métabolites réactifs telles que la NAD(P)H quinone oxydoréductase (NQO1).

Les **Glutathion S-Transférases** (GST) sont des enzymes ubiquitaires, majoritairement cytoplasmiques, possédant un rôle essentiel dans la détoxification de produits électrophiles tels que les aldéhydes, peroxydes et époxydes. En catalysant la conjugaison du glutathion GSH aux agents électrophiles, les GST facilitent leur élimination ⁴¹⁴. Les différentes isoformes de la GST sont régulées par NRF2 ^{435,437,451} ; par exemple, après un traitement anti-oxydant avec du BHA (hydroxyanisole butylé), aucune des différentes isoformes de la Gst n'a été induite chez des souris *Nrf2*^{-/-} par rapport aux souris *Nrf2*^{+/+} ⁴³⁵.

Les **UDP-Glucuronosyl Transférases** (UGT), au nombre de seize, catalysent la réaction de glucuronidation, correspondant à la conjugaison de l'acide UDP-glucuronique. Cela leur confère un rôle dans la détoxification de composés endogènes tels que les stéroïdes, la bilirubine et certaines hormones, mais aussi composés chimiques comme les polluants et les médicaments ⁴⁵². A ce jour, seule la régulation de l'isoforme *Ugt1a6* par *Nrf2* a été mise en évidence. Les cellules hépatiques et pulmonaires issues de souris *Nrf2*^{-/-} présentent une expression basale de cette protéine diminuée par rapport aux cellules provenant de souris sauvages ⁴²⁰.

Les **NAD(P)H Quinone Oxydoréductases** (NQO), notamment NQO1 et NQO2, sont des enzymes cytoplasmiques ubiquitaires, catalysant la réduction des quinones en hydroquinones ⁴⁵³. Leurs activités varient selon les individus et les tissus. Ces protéines sont fortement exprimées dans différents types de cancers comme le cancer du colon, du sein, du pancréas et du poumon ⁴⁵³. Long *et al.* ont montré que des souris *Nqo1*^{-/-} sont plus susceptibles de développer des mélanomes suite à l'application cutanée de benzo[a]pyrène par rapport aux souris *Nqo1*^{+/+} ⁴⁵⁴. De plus, ces souris *Nqo1*^{-/-} sont plus sensibles aux radiations-γ et développent des adénocarcinomes pulmonaires, contrairement aux souris sauvages ⁴⁵⁵. Par ailleurs, l'expression de NQO2 est induite après un traitement avec un agent anti-oxydant, le tert-butylhydroquinone (t-BHQ). L'inactivation de NRF2 par siRNA dans des cellules HepG2 réduit son expression malgré ce traitement ⁴⁵⁶.

3.2.3. Les autres gènes régulés par NRF2

Des études de *microarrays* ont mis en évidence d'autres gènes régulés par NRF2. Parmi eux, les gènes codant les transporteurs d'efflux de substances intracellulaires et de xénobiotiques, dépendants de l'ATP, appelés protéines MRD (*multi-drug resistance associated proteins*) et MRP (*multi-resistance proteins*) ^{437,457}.

Ces protéines appartiennent à la famille de transporteurs ABC, composée de neuf membres (MRP1 à MRP9) et participent à la réponse anti-oxydante en éliminant les xénobiotiques dans le milieu extracellulaire ^{458,459}. En effet, les phénomènes de détoxification peuvent être couplés à l'action de transporteurs membranaires afin de supprimer les produits chimiques toxiques et diminuer les dommages cellulaires ⁴²³. L'expression des protéines ABC est régulée par le facteur NRF2. Ainsi, l'expression génique et protéique basale de Mrp1 de cellules MEF *Nrf2*^{-/-} est significativement plus faible que celle observée dans les cellules sauvages. A l'inverse, son expression est augmentée uniquement dans les cellules MEF *Nrf2*^{+/+} après traitement par le DEM ⁴⁶⁰. De même, des cellules hépatiques traitées par des activateurs de NRF2 (oltipraz et BHA) expriment plus fortement les protéines MRP1-6 ⁴⁶¹. L'oltipraz engendre également l'expression génique de *MDR1*, *MRP1*, *MRP3* et *NQO1* dans des hépatocytes primaires humains ⁴⁶².

Enfin, NRF2 régule la transcription d'une multitude d'autres gènes impliqués dans divers processus cellulaires (**Tableau 6**).

Fonctions cellulaires	Gènes régulés par NRF2
Biosynthèse du glutathion	Gamma glutamylcystéine synthétase (γ -GCS) Glutamate-S-transférase (GST) (<i>GST A1-4, M1-5</i>) Glutamate cystéine ligase (GCL) (<i>GCLC et GCLM</i>) Glutathion réductase (GR) (<i>GR1</i>) Glucose-6-phosphate déshydrogénase (<i>G6PDH</i>) Glutathion peroxydase (GPX) (<i>GPX2</i>)
Métabolisme des xénobiotiques	NAD(P)H quinone oxydoréductase (NQO) (<i>NQO1 et NQO2</i>) UDP-glucuronosyltransférase (UGT) (<i>UGT1A1, A6, A9, 2B7</i>) Epoxyde hydrolase microsomale (mEH) (<i>EPHX1</i>) Aldo-Kéto réductase (AKR) (<i>AKR1B7, 1B8, 1B10, 1C1-2 et 7A2</i>)
Réponse au stress	Hème Oxygénase-1 (<i>HMOX1</i>) Protéine de choc (Heat shock protein, HSP) (<i>HSP1, 8, 40, 70, 105</i>)
Métabolisme du fer	Ferritine (<i>FTL1, FTH1</i>)
Transporteurs	Multi-résistance protéine (MRP) (<i>MRP1-3</i>)
Défense anti-oxydante	Superoxyde dismutase (SOD) (<i>SOD1-3</i>) Peroxyrédoxine (PRDX) (<i>PRDX1-6</i>) Thioredoxine (TRX) Thioredoxine réductase (TRXR) (<i>TRXR1</i>) Catalase (CAT)
Autophagie	Séquestosome 1 (SQSTM1), p62
Apoptose	Bcl-2, Bcl-xl
Protéasome	20S (PSBA1, PSMA4, PSMB3, PSMB5 et PSMB6) 19S (PSMC1, PSMC3 et PSMD14) 11S (Pa28 $\alpha\beta$)

Tableau 6: Liste de gènes régulés par le facteur NRF2.

D'après ^{425,442,457,463-465}.

4. Mécanismes régulant la voie NRF2-KEAP1

En conditions physiologiques, NRF2 est séquestré par le dimère KEAP1, ce qui permet au complexe CUL3/RBX1-E3 d'ubiquitinyler NRF2 et d'induire sa dégradation par le protéasome 26S. Ce facteur de transcription a une demi-vie courte, comprise entre 15 et 20 minutes ⁴²⁵. A ce jour, plusieurs mécanismes d'activation de NRF2 ont été décrits.

4.1. Le modèle *hinge et latch*

Ce modèle repose sur les différences d'affinité entre les motifs ETGE et DLG de NRF2 avec le domaine Kelch de KEAP1. En effet, le motif ETGE a une affinité 100 fois plus importante que DLG pour le domaine Kelch. Ainsi, ETGE agit comme charnière [*hinge*] entre les deux protéines NRF2 et KEAP1, alors que DLG fonctionne comme un loquet [*latch*] ⁴²⁴. A l'état d'homéostasie, les motifs ETGE et DLG de NRF2 sont tous deux liés à un motif Kelch de l'homodimère KEAP1, conformation assurant l'ubiquitination de NRF2 au niveau de son domaine Neh2 ⁴²⁴. En revanche, lors d'un stress oxydatif, les résidus cystéines des domaines BTB et IVR de KEAP1 sont oxydés. Cela induit un changement conformationnel suivi de la dissociation du motif DLG de Kelch alors que le motif ETGE reste associé à KEAP1 ⁴⁶⁶⁻⁴⁶⁸. Cette conformation de « loquet ouvert » empêche l'accès de l'ubiquitine ligase au domaine Neh2 de NRF2, favorisant de ce fait la stabilisation et l'accumulation de ce facteur. Il s'en suit une translocation nucléaire de NRF2 puis la formation d'hétérodimères NRF2-MAF, capables de se fixer au niveau de séquences ARE et d'induire la transcription de gènes cibles anti-oxydants (**Figure 25**) ⁴²⁴.

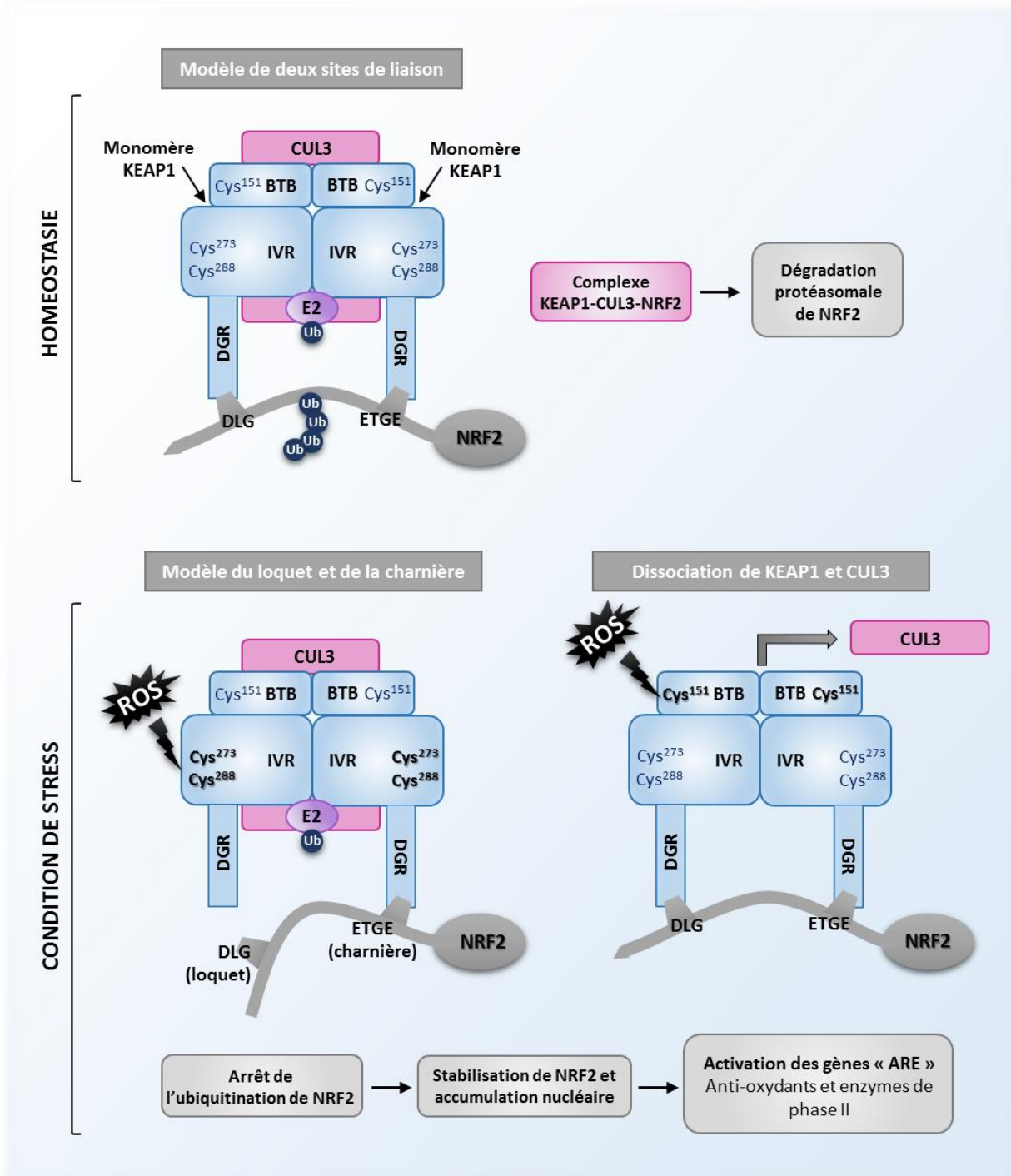


Figure 25: Mécanismes de stabilisation de NRF2.

En condition homéostasique, NRF2 interagit avec le domaine DGR de KEAP1 grâce à ses motifs ETGE (hinge) et DLG (latch), ce qui conduit à sa dégradation protéasomale. A l'inverse, en condition de stress, les modifications des résidus cystéines de KEAP1 engendrent une modulation conformationnelle responsable de sa perte d'interaction avec le motif DLG de NRF2, suivie d'une suppression de l'ubiquitination de celui-ci (modèle du « loquet et de la charnière »). Alternativement, des facteurs de stress peuvent causer la dissociation du complexe KEAP1-CUL3, prévenant ainsi l'ubiquitination et la dégradation protéasomale subséquente de NRF2. Adapté de Magesh et al., 2012 ⁴²⁴.

4.2. Changement conformationnel de KEAP1 et dissociation avec CUL3

En condition de stress oxydatif ou électrophile, l'oxydation de KEAP1 au niveau de son résidu Cys151, situé dans le domaine BTB et interagissant avec CUL3, ainsi que des Cys273 et Cys288 du domaine IVR, engendre la libération de zinc, un changement conformationnel et l'inhibition de l'ubiquitination du facteur NRF2⁴¹⁸. Notons que lorsque la cystéine 151 est le seul résidu à être oxydé, la conformation de KEAP1 reste inchangée malgré que le complexe CUL3-E3 ligase en soit dissocié^{418,469}. Le facteur NRF2 est donc toujours fixé à l'homodimère de KEAP1 mais ne peut être ubiquitinylé. Les protéines NRF2 néo-synthétisées ne pouvant être dégradées, cela provoque une accumulation de cette molécule puis une translocation nucléaire⁴²⁴.

4.3. Le modèle de conformation cyclique

Connue pour l'étude des interactions moléculaires, la méthode de FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) réalisée dans le cas des protéines de fusion EGFP–NRF2 et KEAP1–mCherry a permis de mettre en évidence un nouveau modèle de régulation : le modèle de conformation cyclique, autrement appelé modèle « d'attachement et de régénération cyclique séquentiel »⁴⁷⁰. Deux conformations sont décrites pour le complexe NRF2/KEAP1.

A l'état basal, les protéines NRF2 néo-synthétisées se fixent à KEAP1 au niveau de leurs domaines ETGE ; le complexe NRF2-KEAP1 se trouve alors dans un état dit « ouvert ». Dans un second temps, le domaine DLG se lie à la deuxième molécule de KEAP1 et induit une conformation dite « fermée » (**Figure 26**). Celle-ci permet une orientation correcte des lysines de NRF2 présentes au niveau de son hélice α et donc leur ubiquitination par l'enzyme E3 ligase. Le facteur NRF2 est ensuite libéré et dégradé par le protéasome. Aussi, l'homodimère KEAP1 rendu disponible peut se lier à une nouvelle protéine NRF2 néo-synthétisée⁴⁷⁰. Au contraire, lorsque l'activation de NRF2 est induite après traitement avec divers agents tels que le sulforaphane et le sulfoxythiocarbamate (STCA), s'en suivent l'oxydation des cystéines de KEAP1 et une modification conformationnelle responsable de la stabilisation du complexe NRF2-KEAP1 en position fermée. Cela ne permet donc plus l'ubiquitination et la dégradation de NRF2. Aussi, la non-dissociation du complexe NRF2-KEAP1 est à l'origine d'une diminution du nombre de molécules KEAP1 libres pouvant se lier avec des protéines NRF2 néo-synthétisées, qui peuvent ainsi transloquer dans le noyau et engendrer la transcription des gènes cibles. Dans ce modèle, NRF2 agit donc comme substrat permanent inactivateur de KEAP1⁴⁷¹.

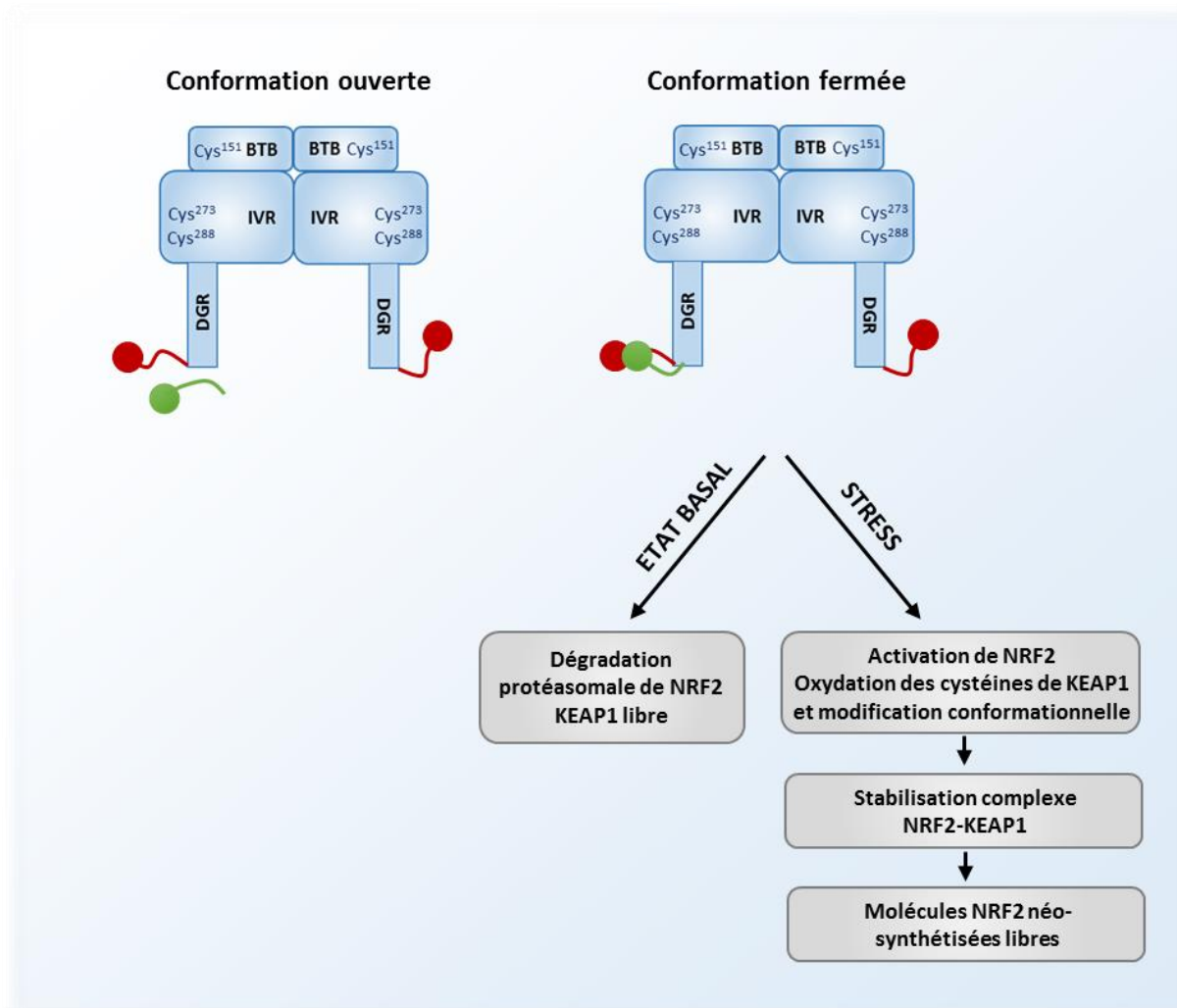


Figure 26: Modèle de conformation cyclique du complexe NRF2-KEAP1.

Ce modèle a été mis en évidence grâce à la méthode FRET, en utilisant des protéines NRF2-EGFP et KEAP1-mCherry. A l'état basal, NRF2 interagit au niveau de son domaine ETGE avec un monomère de KEAP1 ; le complexe NRF2-KEAP1 est dans une conformation dite « ouverte ». Dans un second temps, NRF2 interagit avec les deux monomères KEAP1 à l'aide de ses domaines ETGE et DLG ; cela forme un complexe NRF2-KEAP1 en une conformation dite « fermée ». Le facteur NRF2 est ensuite soit dégradé par le protéasome, soit stabilisé et activé en condition de stress. Adapté de Baird et al., 2014^{470,471}.

4.4. L'oxydation des cystéines de NRF2

Des modifications de résidus cystéines du facteur NRF2 peuvent être impliquées dans sa localisation intracellulaire et donc réguler son activation. NRF2 possède des séquences NLS au niveau de ses domaines Neh2 et Neh1, alors que les séquences NES sont présentes au niveau des domaines Neh5 et Neh1, correspondant respectivement aux régions NESTA et NESZIP. Notons que le site NESTA contient un résidu cystéine sensible à un stress oxydatif : Cys183⁴⁷².

En condition basale, le signal NES est plus important que celui du NLS ; la protéine NRF2 a donc une localisation majoritairement cytoplasmique ⁴⁷². En effet, l'existence de plusieurs motifs NES et NLS au niveau de sa séquence permet à NRF2 de maintenir une ségrégation cytosolique, les motifs NES contrebalançant la force motrice du signal de localisation nucléaire ⁴⁷². A l'inverse, un état induit suite à un traitement par le t-BHQ engendre l'oxydation du résidu Cys183, l'inactivation du signal NES présent dans le domaine transactivateur de NRF2 et la relocalisation nucléaire de ce facteur ⁴⁷². De plus, l'arsenic et le t-BHQ peuvent provoquer l'oxydation d'autres cystéines : Cys235, Cys311, Cys316, Cys414 et Cys506. Ces dernières sont responsables de la dissociation du complexe NRF2/KEAP1, suivi de l'arrêt de l'ubiquitination de NRF2 et donc de sa stabilisation et de son activation ⁴⁶⁵.

4.5. Modifications post-traductionnelles du complexe NRF2-KEAP1

4.5.1. Phosphorylation de NRF2

La phosphorylation de NRF2 se fait selon deux phases : une précoce et l'autre tardive. La phase précoce correspond à l'activation de la transcription des gènes cibles de NRF2, et se produit en réponse à une exposition des cellules à des agents pro-oxydants. Il s'en suit une phase tardive de phosphorylation de ce facteur, caractérisée par son export nucléaire et l'arrêt de la transcription de ses gènes cibles.

4.5.1.1. La phase précoce de phosphorylation

Lors de la phase précoce, la protéine NRF2 peut être phosphorylée par diverses kinases, telles que la protéine kinase C (PKC), les MAPK (sérines-thréonines kinases : ERK, JNK et p38), la PI3K ainsi que la CK2 (caséine kinase 2).

Par exemple, un traitement anti-oxydant au t-BHQ génère la modification des résidus cystéines de KEAP1 et la phosphorylation par la protéine PKC de la sérine 40 de NRF2, située au niveau de son domaine Neh2. Cela favorise sa libération et sa translocation nucléaire ⁴⁷³. De même, le sulforaphane et le t-BHQ activent les protéines MAPK ^{474,475}. L'inhibition de ces protéines dans la lignée hépatocytaire HepG2 induit une diminution de l'expression et de l'activité des enzymes glutathion-S-transférases, cibles de NRF2 ⁴⁷⁶. Toutefois, il a été démontré que l'inhibition de la protéine p38 dans ces mêmes cellules augmente l'activité de NQO1 après un traitement anti-oxydant avec du t-BHQ, suggérant une régulation négative de NRF2 par p38 ⁴⁷⁷. Des études de spectrométrie de masse ont révélé la phosphorylation de NRF2 au niveau des résidus Thr559, Ser558, Ser215, Ser408 et Ser577, les trois derniers étant causés par l'activation des MAPK. Néanmoins, des mutations

ponctuelles de ces cinq sites n'affectent pas l'activité de NRF2 et une controverse existe quant au rôle joué par les MAPK dans son activation ⁴⁷⁵.

La phosphorylation de NRF2 peut également être réalisée par la protéine PI3K. En effet, le traitement de kératinocytes NHEK avec un inhibiteur de cette protéine, le LY294002, empêche la liaison de NRF2 aux séquences ARE malgré son activation par un agent anti-oxydant (extrait de la plante Grande Camomille) ⁴²⁰.

La protéine kinase CK2 peut elle aussi phosphoryler le domaine de transactivation de NRF2, au niveau des sites Neh4 et Neh5. Dans des cellules de neuroblastome humain (IMR-32), un traitement au t-BHQ engendre la phosphorylation du domaine de transactivation par la CK2. *In vivo*, cette phosphorylation permet la translocation nucléaire de NRF2 et la transcription de ses gènes cibles ⁴⁷⁸. L'inhibition de la protéine CK2 par le DMAT (2-diméthylamino-4,5,6,7-tétrabromo-1H-benzimidazole) prévient l'activité du domaine de transactivation de NRF2 et diminue l'expression des protéines cibles NO-1 et NQO1 ⁴⁷⁸.

Ainsi, la nature des phosphorylations est variable selon l'inducteur et le modèle cellulaire, et peut être la cause de la formation d'hétérodimères différents (NRF2-MAF ou NRF2-JUN).

4.5.1.2. La phase tardive de phosphorylation

Au cours de la phase tardive, la phosphorylation de NRF2 est réalisée par la protéine GSK3 β (*Glycogène Synthase Kinase 3 β*) et provoque l'arrêt de son activité selon divers mécanismes. Cette modification post-traductionnelle peut inhiber la fixation de NRF2 au niveau des séquences ARE cibles, notamment au niveau du promoteur de *HMOX1*, mais aussi activer l'export nucléaire de NRF2 ⁴⁷⁹.

4.5.2. Phénomènes d'acétylation et désacétylation de NRF2

Les co-activateurs transcriptionnels comme p300 et CBP sont à l'origine des phénomènes d'acétylation et désacétylation de NRF2.

Par exemple, le traitement de cellules embryonnaires rénales HEK293T par l'Arsenic As(III) conduit à l'acétylation des résidus lysines du domaine Neh1 par le complexe CBP/p300 qui possède une activité histone acétyltransférase intrinsèque ⁴⁸⁰. Par ailleurs, la protéine CBP peut se lier à NRF2 au niveau de son domaine transactivateur Neh4 et Neh5. L'inhibition de CBP par la protéine adénovirale E1A engendre une diminution de l'activité transcriptionnelle de NRF2 ⁴⁸¹. Cela peut s'expliquer par le fait que l'acétylation de NRF2 favorise sa localisation nucléaire, tandis qu'une désacétylation (par la désacétylase Sirtuine 1) empêche sa fixation aux séquences ARE et provoque sa relocalisation cytoplasmique ⁴⁸².

Cependant, le rôle de l'acétylation dans l'activation de NRF2 est controversé. En effet, il a été montré que la désacétylation de NRF2 par l'histone désacétylase 2 (HDAC2) permet

également la stabilisation de ce facteur de transcription et l'expression de ses gènes cibles. Ainsi, le traitement de cellules épithéliales bronchiques BEAS2B par un inhibiteur de HDAC, la trichostatine A, augmente l'acétylation de NRF2, ce qui diminue sa stabilité en présence d'H₂O₂ et réduit l'expression de ses gènes cibles ⁴⁸³.

4.5.3. Ubiquitination de KEAP1

La voie NRF2/KEAP1 peut aussi être régulée par des phénomènes d'ubiquitination de KEAP1. Effectivement, cette protéine peut être la cible de la culline E3 ligase après traitement avec des activateurs de NRF2 [t-BHQ et IAB (N-iodoacetyl-N-biotinylhexylenediamine)]. Son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome induisent une augmentation du taux de NRF2 et la transcription de ses gènes cibles ^{484,485}.

4.6. Régulation par les microRNAs

Les microRNAs (ou miR) sont de courts ARNs simple brin non codants, de 20 à 23 nucléotides. Les miRs matures forment avec les protéines Argonautes le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*), ayant la capacité de se lier au niveau de la région 3'-UTR des ARNm cibles. Cela engendre leur dégradation et donc l'inhibition de leur traduction ⁴⁸⁶. De récentes études ont démontré une régulation du complexe NRF2/KEAP1 par des miRs, tels que miR-144, miR-28, miR-200, miR-34 et miR-141. Par exemple, l'expression de miR-144 par des cellules érythroïdes provoque une diminution du niveau protéique de NRF2 et une réduction de la régénération du glutathion, altérant ainsi le pouvoir anti-oxydant de ces cellules ^{487,488}. A l'inverse, les miR-200 et miR-141 entraînent la dégradation de KEAP1 et une hyper-activation du facteur NRF2 ⁴⁸⁹.

4.7. Régulation indirecte de la voie NRF2-KEAP1

Si la régulation de la voie NRF2/KEAP1 est majoritairement directe, elle peut aussi s'effectuer de manière indirecte en mettant en jeu les différents partenaires protéiques de ces deux molécules.

4.7.1. Les protéines partenaires de KEAP1

Le facteur de transcription NF- κ B, composé des deux sous-unités p50 et p65 sous sa forme canonique, est lié à son inhibiteur endogène I κ B à l'état basal. Il induit la transcription de gènes impliqués dans la prolifération et l'invasion cellulaire, l'inflammation et la réponse

immune⁴⁹⁰. L'**IκB kinase β** ou **IKKβ**, protéine activatrice du facteur NF-κB, a été décrite comme partenaire de KEAP1 : IKKβ possède un motif ETGE, similaire à celui de NRF2 et permettant son interaction avec KEAP1. Cela engendre son ubiquitination et inhibe de ce fait la voie NF-κB⁴⁹¹.

De manière intéressante, KEAP1 est capable d'interagir directement avec la **sous-unité p65 du facteur NF-κB** *in vitro* et *in vivo*, ce qui régule négativement NRF2. Dans la lignée rénale embryonnaire transformée HEK293T, la translocation nucléaire de KEAP1 est favorisée suite à la surexpression de p65, alors que la liaison de NRF2 à ses gènes cibles est réduite et que les niveaux de sa forme ubiquitinylée sont augmentés⁴⁹².

La **protéine séquestosome 1 (SQSTM1)**, a été mise en évidence comme étant un nouveau partenaire de KEAP1 suite à des études de spectrométrie de masse. La surexpression de SQSTM1, connue pour permettre le transport de protéines poly-ubiquitinées vers la dégradation protéasomale ou lysosomale, entraîne une diminution de l'expression de KEAP1 concomitante avec une élévation du taux protéique de NRF2⁴⁹³.

Substrat pour l'autophagie, la **protéine p62** possède un domaine KIR la rendant capable de se lier au domaine Kelch de KEAP1. Ainsi, une surproduction de p62 ou une déficience en autophagie conduit à une compétition entre cette protéine et NRF2 pour l'interaction avec KEAP1. Cela entraîne la stabilisation de NRF2 suite à l'inhibition de son ubiquitination et l'activation transcriptionnelle de ses gènes cibles⁴⁹⁴. En effet, la surexpression de p62 dans les cellules HEK293T favorise l'expression de NRF2 et la transcription de ses cibles *HMOX1*, *NQO1*, *GCLM* et *MRP2*⁴⁹⁵. De plus, le facteur NRF2 régule positivement p62, suggérant l'existence d'un rétro-contrôle positif⁴⁹⁶.

L'**importine α7** ou **protéine kayryophérine α6 (KPNA6)** a un rôle dans le transport nucléo-cytoplasmique de KEAP1. Le domaine C-terminal de KPNA6 interagit avec le domaine Kelch de KEAP1, permettant l'import nucléaire de cette dernière. Après la liaison de KEAP1 avec le facteur NRF2, ce complexe est exporté dans le cytoplasme et NRF2 dégradé par le protéasome. A l'inverse, l'invalidation de KPNA6 par siRNA stabilise et favorise l'activation de NRF2⁴⁹⁷.

D'autres protéines peuvent se lier à KEAP1, dont la **phosphoglycérate mutase 5 (PGAM5)**. Cette molécule est une sérine/thréonine phosphatase, localisée au niveau de la membrane externe mitochondriale. Son interaction avec la protéine KEAP1 provoque sa dégradation protéasomale⁴⁹⁸. Celle-ci est inhibée lorsque les cellules cancéreuses de sein MDA-MB-231 sont traitées par le sulforaphane ou le t-BHQ⁴⁹⁹.

4.7.2. Protéines partenaires de NRF2

Retrouvée dans les invaginations de la membrane plasmique riches en lipides et cholestérol (ou cavéoles), la protéine **Cavéoline-1 (CAV-1)** impliquée dans les phénomènes d'endocytose et de transport lipidique est également partenaire de NRF2⁵⁰⁰. Situé entre les régions Neh5 et Neh6, NRF2 possède un domaine CBD [(*Caveolin-1 Binding Domain*), aa281-aa289] pouvant se lier au domaine CSD [(*Caveolin-1 Scaffolding Domain*), aa82-aa101] de la Cavéoline-1. Cette interaction, retrouvée dans le noyau et le cytosol, est responsable de la séquestration de NRF2 à l'état basal, au niveau des cavéoles des cellules MEF. En revanche, l'induction d'un stress oxydatif suite à un traitement à l'H₂O₂ engendre la translocation nucléaire de NRF2⁵⁰¹. De même, l'invalidation de CAV-1 par siRNA dans des cellules épithéliales bronchiques (Beas-2B) donne lieu à la dissociation du complexe NRF2-KEAP1 après traitement au 4-HNE. Cela favorise une réponse anti-oxydante suite à l'activation de la transcription des gènes cibles de NRF2, *HMOX1*, *NQO-1* et *GCLC*⁵⁰⁰.

La protéine **DJ-1 ou Parkinson protein 7 (PARK7)**, impliquée dans l'apparition des cancers ou de maladies neurodégénératives et inflammatoires, possède un rôle anti-oxydant en activant le facteur de transcription NRF2⁵⁰². DJ-1 stabilise l'expression de NRF2 en entrant en compétition avec KEAP1 et supprimant la liaison NRF2-KEAP1⁵⁰³. Ainsi, l'invalidation de *DJ-1* dans une lignée cellulaire humaine de neuroblastome SH-SY5Y induit la diminution de l'expression de NRF2 et de ses gènes cibles, dont *TRX1*, en réponse à l'H₂O₂⁵⁰⁴.

Il devient de plus en plus évident que les protéines **p53** et NRF2 ont des rôles fonctionnellement similaires et permettent aux cellules une atténuation du stress oxydatif accrue. Fait intéressant, Zhang *et al.* ont montré que **p21**, cible de p53^{505,506,507}, stabilise NRF2 en se liant à KEAP1, interférant ainsi avec sa capacité à promouvoir l'ubiquitinylation de NRF2 et sa dégradation par le protéasome⁵⁰⁸. En effet, l'invalidation de p21 par siRNA dans les cellules HCT116 induit une diminution de l'expression et de l'activité transcriptionnelle de NRF2, à l'état basal mais aussi après traitement au t-BHQ ou au sulforaphane⁵⁰⁸. Par ailleurs, la protéine p53 pourrait activer directement le facteur NRF2 dans des cellules cancéreuses. Aussi, après induction d'un stress oxydatif, les cellules de carcinome du colon HCT116 déficientes en p53 présentent une réduction de l'expression des gènes cibles de NRF2 par rapport aux cellules sauvages p53-positives^{507,509}. D'autre part, des résultats antérieurs ont montré que NQO1, cible de NRF2, peut interagir directement avec p53⁵¹⁰ et bloquer sa dégradation par le protéasome 20S⁵¹¹, processus de dégradation indépendant de MDM2 (*Mouse Double Minute 2*) et de l'ubiquitine^{507,512,513}. Si

ces premières données soutiennent l'existence d'une co-régulation positive entre les protéines p53 et NRF2, une régulation négative a récemment été mise en évidence. La protéine MDM2 est une cible transcriptionnelle du facteur NRF2 à travers laquelle il régule négativement p53⁵¹⁴. A l'inverse, p53 peut se lier au niveau de promoteurs connus pour être activés par NRF2. Par un mécanisme de compétition, p53 réprime donc leur transcription^{507,515}.

Les discordances apparentes entre ces données suggèrent que la relation entre NRF2 et p53 pourrait dépendre du contexte cellulaire et biologique.

5. Implication du facteur NRF2 dans les pathologies cancéreuses

Plusieurs études ont démontré que le facteur de transcription NRF2, de part son importance dans le contrôle de l'homéostasie redox des cellules, participe aussi bien à la protection des cellules normales envers un stress oxydatif, qu'au phénomène de cancérogénèse et à la pérennisation des cellules malignes. Ainsi, le rôle de *NRF2* serait bivalent, gène suppresseur de tumeur ou proto-oncogène^{417-420,429,516-518}.

5.1. NRF2, suppresseur de tumeur

Lors des stades précoces du développement de pathologies tumorales, l'activation de NRF2 empêche le processus de carcinogénèse en contrecarrant les conséquences de mutations géniques, responsables d'un stress cellulaire source de mort cellulaire. De ce fait, les traitements ou altérations géniques activant ce facteur suppresseur de tumeur inhibent la tumorigénèse en induisant l'expression de multiples enzymes cytoprotectives et anti-oxydantes, mais aussi en ayant une action anti-inflammatoire⁵¹⁶. L'activation de NRF2 peut être due à la réaction de ces substances médicamenteuses avec des résidus cystéines de nombreuses protéines, dont KEAP1 qui est alors neutralisée. Dans le cas présent, l'inhibition de NRF2 favorise alors le développement du cancer.

Pour exemple, il a été montré que des souris sauvages *Nrf2*^{+/+} développent moins de tumeurs cutanées par rapport aux souris *Nrf2*^{-/-}, après exposition à divers cancérigènes⁵¹⁹. De même, comparativement aux souris dites contrôles, ces souris *Nrf2*-déficientes présentent un nombre accru de tumeurs de l'estomac après exposition à un polluant environnemental et composant de la fumée de cigarette, le benzo[a]pyrene⁵²⁰. En 2006, Keller *et al.* ont utilisé un modèle de kératinocytes basaux épidermiques exprimant un dominant négatif de *Nrf2*, capable de se fixer sur les séquences ARE sans recruter le complexe transcriptionnel nécessaire à l'initiation de la transcription. Ce dominant négatif

empêche alors la fixation de la protéine Nrf2 sauvage au niveau de ces séquences ARE, mais aussi la fixation d'autres facteurs de transcription hypothétiques. Ce modèle d'étude a ainsi permis de mettre en évidence qu'une inactivation du facteur Nrf2 engendre une élévation du taux de mélanomes suite à un traitement avec des agents cancérigènes ⁵²¹.

L'inflammation chronique est une source connue de développement de cancers. NRF2 ayant un rôle anti-inflammatoire décrit, une étude s'est intéressée au lien entre l'expression de ce facteur, le développement d'un phénotype inflammatoire et la progression tumorale. En outre, les souris *Nrf2*^{-/-} présentent une incidence plus importante de développement de tumeurs colorectales, dont le nombre et la taille étaient également élevés, par rapport aux souris sauvages *Nrf2*^{+/+}. Les marqueurs de l'inflammation tissulaire tels que la cyclo-oxygénase-2 et la 5-lipoxygénase étaient surexprimés chez ces souris Nrf2-déficientes ⁵²².

Pour conclure, le facteur de transcription NRF2 possède un rôle suppresseur de tumeur et limite la transformation et la progression tumorale, faisant de cette molécule une cible potentielle pour la prévention de telles pathologies. En conséquence, de nombreux traitements chimio-préventifs supprimant le phénomène de carcinogénèse et d'autres maladies chroniques, sont en réalité des activateurs du facteur anti-oxydant NRF2 ⁵¹⁶. Toutefois, de récentes analyses génomiques de cellules issues de tumeurs montrent que cette protéine peut également être oncogénique et causer une résistance aux chimiothérapies. Le rôle controversé de NRF2 semble en réalité environnement-dépendant ; il serait donc nécessaire d'investiguer et de comprendre le contexte dans lequel son ciblage peut engendrer un effet anti-tumoral ⁵¹⁶.

5.2. Le paradoxe NRF2 : fonctions dépendantes du contexte ?

Comme nous l'avons abordé précédemment, les ROS possèdent des rôles complexes dans le développement de cancers. Aussi, des ROS mutagènes sont impliquées dans le processus de carcinogénèse en promouvant et maintenant un phénotype oncogénique ; une diminution des niveaux de ROS serait donc en faveur de la prévention du cancer. En revanche, des chimiothérapies engendrant une production de ROS sont responsables d'une augmentation du stress oxydatif provoquant la mort de ces cellules malignes. Le contexte cellulaire semble donc déterminant quant à l'effet des ROS, dose-dépendant, dans ce phénomène de tumorigénèse ⁵¹⁶.

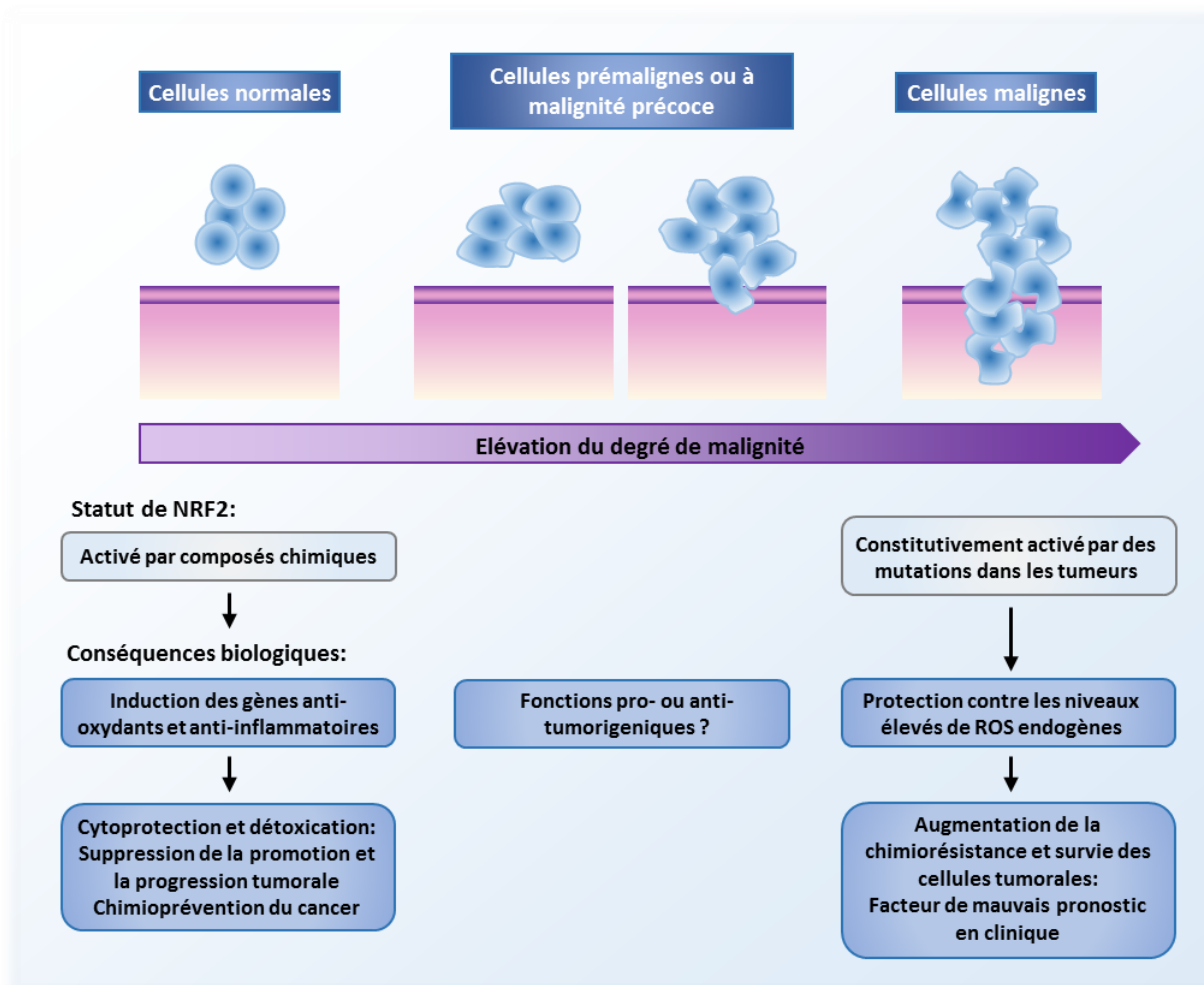


Figure 27: Statut de NRF2 et développement tumoral.

Dans le cas de cellules normales et de stades précoces, l'activité de NRF2 aurait un rôle anti-tumoral. A l'inverse, ses fonctions favoriseraient le développement tumoral lors d'un haut degré de malignité. Figure adaptée de ⁵¹⁶.

La fonction de NRF2 dans le développement cancéreux peut être considérée comme paradoxale. Effectivement, une forte expression tumorale de cette protéine a été décrite comme étant facteur de mauvais pronostic, tandis que des agents anti-oxydants (médicaments, végétaux, nourriture) activateurs de NRF2 améliorent la santé, le vieillissement et peuvent empêcher la cancérogénèse ⁵¹⁶.

Les fonctions de NRF2 seraient dépendantes du stade de tumorigénèse : ainsi il existe un contexte biologique et cinétique (**Figure 27**). Dans le cas de cellules pré-malignes, l'activité de NRF2 diminue le phénotype inflammatoire ainsi que le stress oxydatif cellulaire mutagène, supprimant la carcinogénèse. A l'inverse, les cellules malignes, caractérisées par un grand nombre de mutations oncogéniques, présentent une activation accrue de NRF2 à l'origine d'une résistance aux traitements anti-tumoraux ⁵¹⁶. L'action de NRF2 dépend également de son taux d'expression. Les fonctions effectrices de ce facteur étant intégrées

dans un réseau de signalisation complexe, il est donc possible que différents niveaux d'expression engendrent des effets eux aussi divers.

Enfin, il a été suggéré que les fonctions de NRF2 sont dépendantes du furamate, métabolite du cycle de Krebs. A l'état physiologique, le furamate protège du cancer et possède des propriétés anti-inflammatoires et neuroprotectrices. Toutefois, des niveaux élevés de ce métabolite sont pathologiques et carcinogènes ; le furamate peut en effet se lier à KEAP1 et donc activer NRF2. Il peut également activer le facteur HIF-1 α et engendrer des dysfonctions mitochondriales ⁵¹⁶.

5.3. Oncogène NRF2 et la promotion du cancer

NRF2 offre une protection anti-oxydante tant aux cellules normales que malignes. Son activation constitutive génère des fonctions anti-oxydantes suivies d'une diminution des niveaux de ROS intracellulaires, permettant la survie de ces cellules. L'activité de NRF2 est gérée par plusieurs facteurs : l'impossibilité de KEAP1 de séquestrer NRF2 dans le cytoplasme ; une anomalie fonctionnelle de NRF2 ou de l'expression de son gène ; mais encore la participation du complexe NRF2/KEAP1 dans diverses voies impliquées dans le développement tumoral ⁵¹⁶.

Des mutations des gènes *NRF2* et *KEAP1* peuvent conférer aux cellules cancéreuses un gain de fonction suite à une activation constitutive de NRF2, résultant d'une perte de capacité de liaison avec son inhibiteur naturel KEAP1, dont la conformation tertiaire peut être altérée ⁵²³. Par exemple, des mutations de *KEAP1* sont particulièrement associées à une perte de la répression de NRF2 dans le cancer du poumon. En effet, à partir d'un panel de lignées cellulaires et tumeurs primaires, Singh *et al.* ont démontré que 50% des lignées et 19% des tumeurs présentaient une mutation, insertion ou délétion du gène *KEAP1*, anomalies responsables d'une élévation du niveau d'expression de NRF2 et de la transcription de ses gènes cibles ⁴³⁸. Par ailleurs, dans les adénocarcinomes du poumon, la fréquence de mutation de *KEAP1* est particulièrement élevée ; le promoteur de ce gène peut être hyperméthylé et conduire à la diminution de son expression ⁵²⁴. A l'inverse, l'activité de NRF2 est un facteur de mauvais pronostic ⁵¹⁶. Diverses mutations du gène *NRF2* ont été identifiées dans de nombreux types de cancer, au niveau de la région codant les motifs DLG et ETGE, permettant la fixation à KEAP1 ⁵²⁵.

De plus, des mutations activatrices du gène *NRF2* supprimant l'interaction NRF2-KEAP1 ou une perte de fonction du gène *KEAP1* conduisent à une activation prolongée et constitutive de NRF2 et des voies de signalisation en aval. Cela a été constaté dans de

nombreux types tumoraux, comme les cancers ORL ⁵²⁶, le cancer du sein ⁵²⁷, de l'endomètre ⁵²⁸, du poumon ⁵²⁴ et de la vésicule biliaire ⁵²⁹.

Notons que des oncogènes tels que KRAS, BRAF et MYC induisent la transcription du gène *NRF2* et l'activité de la protéine subséquente. Cela confère aux cellules malignes une activité cytoprotectrice avec une diminution du niveau de ROS intracellulaires, mais aussi des avantages de survie, de prolifération et de différenciation cellulaires ainsi qu'une résistance aux thérapies anti-cancéreuses et xénobiotiques toxiques (**Figure 28**).

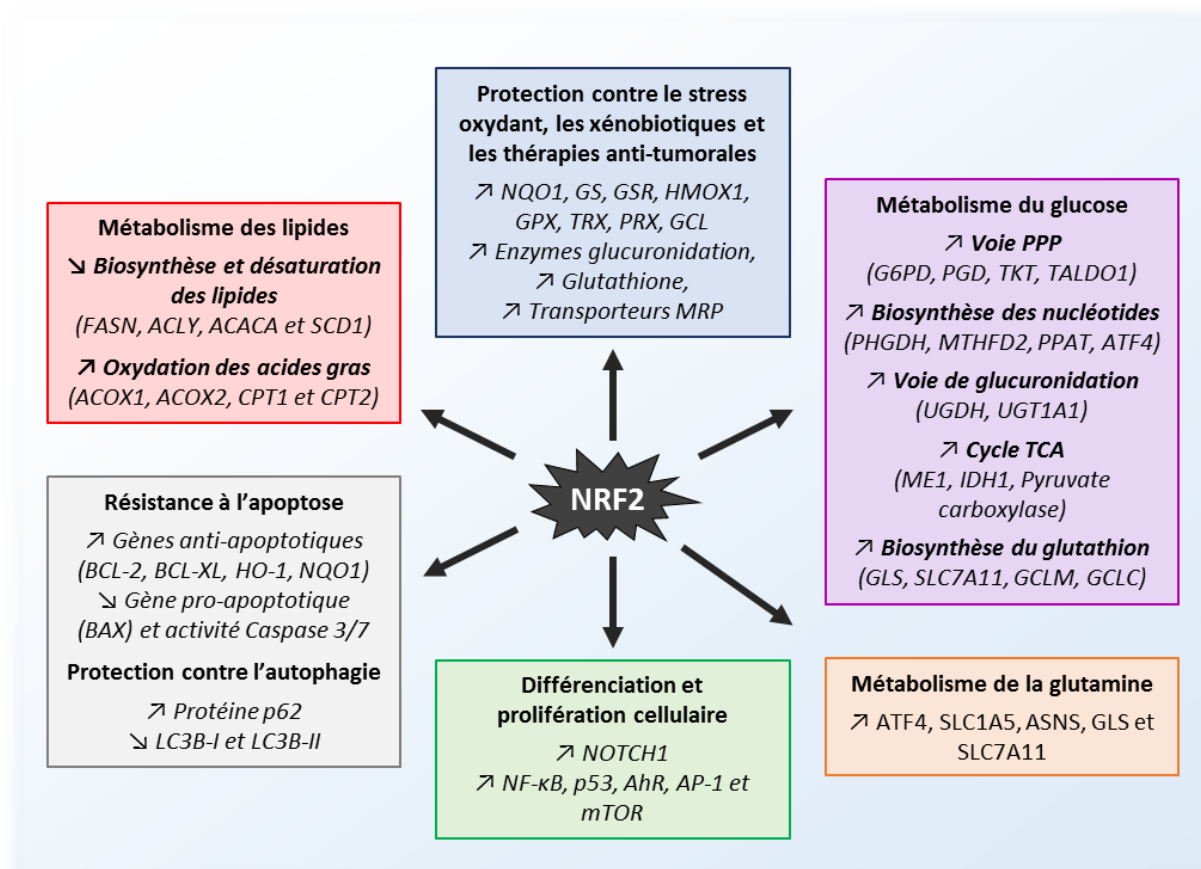


Figure 28: Rôle de NRF2 dans les fonctions cellulaires pro-tumorales.

NRF2 impacte la différenciation, la prolifération et la mort cellulaire, ainsi que le métabolisme des lipides, du glucose et de la glutamine. Ce facteur protège également les cellules cancéreuses contre un stress oxydant, des xénobiotiques et des thérapies anti-tumorales.

5.3.1. NRF2, stress oxydatif et xénobiotiques

5.3.1.1. Protection contre un stress oxydatif

En régulant la transcription de nombreux gènes anti-oxydants et enzymes de détoxification de phase II, *NRF2* protège les cellules tumorales contre des stress oxydatifs ou électrophiles et favorise leur survie ⁵¹⁶. Des études menées sur des souris *Nrf2*-déficientes ont été réalisées afin de caractériser ce mécanisme de protection par *Nrf2*. Ces souris, de phénotype viable, présentent une sensibilité accrue aux molécules toxiques et au stress

oxydant ⁴³⁵. De plus, des fibroblastes embryonnaires murins issus de souris *Nrf2*^{-/-} ont un taux de mortalité augmenté suite à un traitement pro-oxydant avec de la ménadione ⁴⁶⁴. A l'inverse, des kératinocytes provenant de souris transgéniques et exprimant une protéine Nrf2 constitutivement active, ont un nombre de cellules apoptotiques diminué après exposition aux ultra-violet B (UVB) par rapport aux souris sauvages. L'expression des gènes cibles de Nrf2, *Nqo1*, *Gs* et *Gsr* est alors augmentée et la production de ROS diminuée ⁵³⁰.

5.3.1.2. Protection contre les xénobiotiques et les thérapies anti-tumorales

NRF2 pouvant augmenter la résistance aux traitements et la protection vis-à-vis des xénobiotiques toxiques (chimiothérapies pro-oxydantes), le développement d'inhibiteurs de la voie NRF2 est maintenant considéré comme une nouvelle approche thérapeutique ⁵¹⁶. En effet, en plus de supprimer le stress oxydatif causé par ces traitements, NRF2 détoxifie les cellules par de multiples mécanismes : par exemple en induisant la production de glutathione, premier piègeur cellulaire des électrophiles, mais aussi en engendrant l'expression des enzymes de glucuronidation qui se conjuguent aux xénobiotiques pour les excréter. D'autre part, NRF2 peut influencer le transport des médicaments en stimulant la transcription de gènes codants des pompes à efflux ATP-dépendantes. Tous ces mécanismes provoquent donc une diminution de l'efficacité des traitements anti-cancéreux avec l'émergence d'un phénotype de résistance des cellules tumorales ⁵¹⁶.

En effet, il existe une corrélation positive entre le taux d'expression de NRF2 et la résistance aux chimiothérapies comme la doxorubicine, l'étoposide et la cisplatine ⁵³¹. Par exemple, des cellules cancéreuses de sein MCF-7 devenues résistantes au tamoxifène surexpriment le facteur NRF2 et ses cibles HMOX1, TRX, PRX et GCL ⁵³². De plus, les cellules de cancer du poumon A549 exprimant fortement NRF2 et certaines de ses cibles se sont révélées être moins sensibles à la cisplatine que d'autres lignées cellulaires présentant des niveaux d'expressions réduits ⁵³³. Enfin, parmi les transporteurs MRP dont l'expression est modulée par la voie NRF2/KEAP1, se trouve MRP3. Cette régulation a été mise en évidence dans des cancers épithéliaux bronchiques et carcinomes pulmonaires non à petites cellules ⁵³⁴.

En résumé, ces études montrent un rôle de NRF2 dans la pérennisation des cellules malignes suite à l'activation d'un programme de détoxification, supprimant l'action des thérapies anti-tumorales.

5.3.2. NRF2 et survie des cellules tumorales

Outre la régulation du taux de ROS intracellulaire dans les cellules tumorales, le facteur de transcription NRF2 aurait un rôle cytoprotecteur contre les toxiques en contrant les mécanismes de mort par apoptose et autophagie induits par ces agents.

5.3.2.1. Protection contre le mécanisme de mort cellulaire par apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, se caractérise par une condensation de la chromatine, une fragmentation de l'ADN et un bourgeonnement de la membrane plasmique ⁵³⁵. De récentes études ont démontré la capacité de NRF2 à réguler ce mécanisme. Dans le cas de lignées de carcinome pancréatique, les cellules chimio-résistantes Panc1 et Colo357 possèdent une activité constitutive importante de NRF2, contrairement aux cellules chimio-sensibles MiaPaca2 et H6c7 ⁵³⁶. L'inhibition du facteur de transcription NRF2 par l'alcaloïde trigonelline sensibilise les cellules cancéreuses pancréatiques Panc1 et Colo357 à l'apoptose suite à une diminution de l'expression de gènes du protéasome NRF2-dépendants tels que *S5A/PSMD4 (Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 4)* et *A5/PSMA5 (Proteasome Subunit Alpha 5)*. L'activité du protéasome en est diminuée mais il est intéressant de noter que l'inhibition de l'expression de NRF1 par siRNA n'induit pas de modulation de cette activité, suggérant un effet spécifique de l'activité de NRF2 ⁵³⁶. De plus, dans des cellules humaines de glioblastome U251, une sur-activation du facteur NRF2 engendre une diminution du taux d'apoptose, accompagnée d'une élévation de l'expression des protéines HMOX1 et BCL-2/BAX, ainsi qu'une diminution de l'expression et de l'activité des caspases 3 et 9 ⁵³⁷. Ces données ont été confirmées dans le cas de cellules de mésothélium malin MSTO-211H et H2452. Par ailleurs, l'utilisation de siRNA ciblant l'ARNm *NRF2* provoque une sensibilité accrue de ces cellules au traitement anti-cancéreux cis-platine, probablement suite à une potentialisation du stress oxydatif engendré par cet agent thérapeutique ⁵³⁸.

5.3.2.2. Protection contre le mécanisme de mort cellulaire par autophagie

L'autophagie, phénomène caractérisé par la dégradation des organites et du cytoplasme par les lysosomes, est un mécanisme permettant le maintien de l'homéostasie cellulaire ⁵³⁹. Comme évoqué précédemment, la protéine p62, ayant un rôle dans l'autophagie, est capable de se lier au domaine Kelch de KEAP1 et permet de ce fait la stabilisation de NRF2. Réciproquement, ce facteur de transcription régule positivement l'expression de p62 ⁴⁹⁶. En conditions physiologiques, l'autophagie induite par une privation en nutriments résulte d'une augmentation de l'expression de la protéine LC3B-II et une diminution de LC3B-I (*Autophagy-Related Protein Light Chain 3 Beta I/II*). Or, Zhu *et al.* ont mis en évidence une régulation négative de ces deux protéines suite à la surexpression de

p62 induite par NRF2, dans des cellules épithéliales pulmonaires. Ce résultat est surprenant car p62 était alors connue pour assurer l'agrégation et l'élimination protéasomale de protéines mal conformées après leur ubiquitinylation, ainsi que pour permettre la formation des autophagosomes et donc d'initier le processus d'autophagie ⁵⁴⁰. Cette étude met donc en évidence un rôle antagoniste de p62, la réponse NRF2 régulant négativement l'autophagie en empêchant la formation des autophagosomes suite à la surexpression de cette protéine ⁵⁴¹.

5.3.3. Différenciation et prolifération cellulaire

Le facteur NRF2 aurait également pour cibles des gènes impliqués dans les phénomènes de différenciation et prolifération cellulaire ⁵¹⁶. Dans des cellules souches de moelle osseuse et d'intestin, NRF2 induit la transcription de *NOTCH1* (*Translocation-Associated Notch Protein TAN-1*), gène codant une protéine contrôlant le potentiel de prolifération et de différenciation des cellules malignes, rendant de ce fait la tumeur plus agressive ⁵¹⁶.

Enfin, la voie NRF2/KEAP1 peut interagir avec d'autres voies de signalisation telles que NF- κ B, p53, *Aryl hydrocarbon hydroxylase receptor* (AhR), AP-1 et mTOR. L'activation de la voie Nrf2/Keap1 est également possible par les oncogènes Braf, Kras et Myc, comme cela a été démontré dans des fibroblastes d'embryons murins ⁵⁴².

Pour conclure, ce complexe module de nombreuses activités cellulaires en plus de son rôle homéostatique cytoprotecteur et influence des processus divers comme l'inflammation, la prolifération, l'apoptose, la différenciation, la régénération tissulaire ainsi que le métabolisme cellulaire.

5.3.4. NRF2 et reprogrammation métabolique

5.3.4.1. Métabolisme du glucose

De nombreuses voies de détoxification régulées par NRF2 ont une activité nécessitant un apport de glucose. Fait intéressant, en plus de réguler les enzymes de ces voies métaboliques, le facteur NRF2 module également leur apport en métabolites. En effet, l'activation de Nrf2 peut entraîner une augmentation de l'absorption du glucose dans les fibroblastes embryonnaires murins ⁵⁴³. En revanche, une interférence avec l'apport de glucose inhibe la détoxification des ROS par Nrf2 ³⁸⁷. Ainsi, la reprogrammation du métabolisme cellulaire soutient la réponse anti-oxydante et l'état de prolifération incontrôlée des cellules tumorales. NRF2 augmente le flux des voies métaboliques impliquées dans

cette réponse au stress oxydatif, en induisant l'expression de nombreuses enzymes ayant un rôle dans la voie PPP [G6PD, PGD, TKT (*Transketolase*), TALDO1 (*Transaldolase 1*)], la voie de biosynthèse des nucléotides [PHGDH, MTHFD2 (*Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase 2*), PPAT (*Amidophosphoribosyl transférase*)], la voie de glucuronidation (UGDH), le cycle TCA [ME1 (*Enzyme malique 1*), IDH1] et des enzymes dans la voie de biosynthèse du glutathion (GLS, SLC7A11, GCLM, GCLC). De manière concomitante, NRF2 réprime la voie de biosynthèse des lipides [ACLY, ACC, FASN, SCD1 (*Stéaroyl-CoA désaturase 1*)] pour éviter les réactions de détoxication du NADPH. En fournissant les substrats nécessaires aux réactions enzymatiques, la voie NRF2 permet donc le bon fonctionnement des enzymes métaboliques dont elle induit les expressions (**Figure 29**)³⁸⁷.

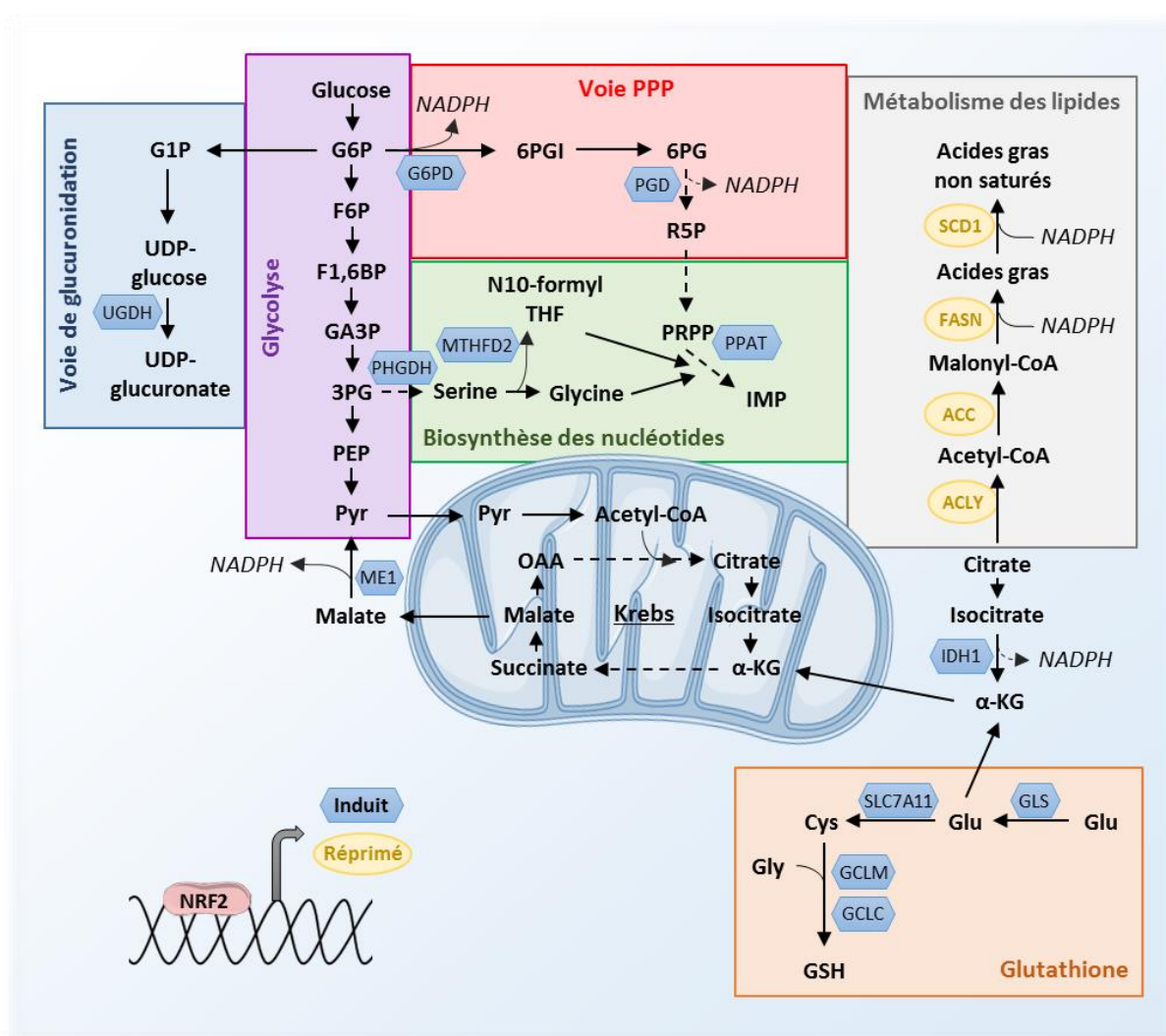


Figure 29: Implication de NRF2 dans le métabolisme du glucose.

En plus de moduler la voie de la glycolyse, le facteur NRF2 régule les voies de la glucuronidation, des pentoses phosphates (PPP), de la biosynthèse des nucléotides, de la glutathione ainsi que le métabolisme des lipides. NRF2 régule également la voie de la glutamine, non représentée ici. Figure adaptée de³⁸⁷.

5.3.4.1.1. Voie des pentoses phosphates (PPP)

Au niveau de la voie des pentoses phosphates, NRF2 régule l'expression des enzymes de la branche oxydative (G6PD et PGD) et non-oxydative (TKT, TALDO1)⁵⁴⁴, soutenant de ce fait la production de NADPH et de nucléotides (figure 29). Par exemple, une étude menée sur des cellules de glioblastome a montré que la surexpression de NRF2 provoque une augmentation des taux de transcriptase inverse de la télomérase humaine (hTERT), et l'expression de deux enzymes de la voie PPP, la G6PD et TKT, pouvant favoriser la progression de ce type de cancer⁵⁴⁵. En outre, l'expression de la TKT par NRF2 neutralise le stress oxydatif cellulaire et conduit au développement tumoral⁵⁴⁶.

Il a récemment été montré que la prolifération cellulaire engendrée par NRF2 est supportée par la voie PPP, qui produit le NADPH nécessaire au maintien du glutathion à l'état réduit^{387,544,547}.

La synthèse *de novo* des nucléotides puriques est réalisée à partir de R5P, en 10 étapes, pour produire de l'inosine monophosphate (IMP) ensuite métabolisée en AMP et GMP. En favorisant l'activité de la voie PPP et en augmentant les niveaux de R5P, NRF2 influence la production des purines et des pyrimidines. Ainsi, NRF2 soutient la biosynthèse des nucléotides par des mécanismes transcriptionnels directs et en modulant le métabolisme cellulaire pour distribuer les intermédiaires métaboliques dans ces différentes voies³⁸⁷.

De plus, ce facteur régule la voie de biosynthèse de la sérine en induisant l'expression des gènes *ATF4* (*Activating Transcription Factor 4*) et *PHGDH*, et conduisant à une indépendance vis-à-vis des sources exogènes de sérine³⁹³. L'activation de cette voie peut représenter une contribution significative à l'activité pro-tumorigène de NRF2. En effet, la glycine dérivée de la sérine favorise le métabolisme du glutathion, dont la composition en cystéine provient majoritairement d'une source exogène, dans un milieu riche en nutriments. Lors de conditions de privation en nutriments, la cystéine dérivée de la sérine joue donc un rôle primordial et réduit la dépendance des cellules envers les sources extracellulaires^{387,393,548}. En synergie avec la voie PPP, la glycine et les intermédiaires du cycle du folate sont des sources de riboses pour la biosynthèse des nucléotides puriques et pyrimidiques. Pour résumer, en régulant la production des acides aminés sérine et glycine, mais aussi les enzymes les utilisant comme substrat, le facteur NRF2 influence le devenir de ces acides aminés et les dirige dans des voies de réponse à un stress oxydatif³⁸⁷.

5.3.4.1.2. Voie de glucuronidation

Impliquées dans le processus de glucuronidation et régulées par NRF2, les UDP-glucuronosyltransférases, comme l'enzyme UGT1A1, transfèrent le composant acide glucuronique de l'acide UDP-glucuronique sur les substrats, dont les médicaments, la

bilirubine et les hormones. Cela permet d'augmenter la solubilité de ces molécules pour favoriser leur excrétion. Enfin, l'UDP-glucuronate est synthétisé à partir d'UDP-glucose, par l'UDP-glucose déshydrogénase (UGDH), enzyme dont l'expression est régulée par NRF2 (**Figure 29**)^{36,387,127}.

Le facteur NRF2 favorise donc l'expression d'enzymes participant à la synthèse d'UDP-glucuronate, ainsi que l'absorption du glucose pour maintenir l'entrée du G6P dans cette voie.

5.3.4.1.3. Cycle TCA

Dans le cas des cellules en prolifération, la majorité du carbone entrant dans le cycle TCA ou cycle de Krebs est utilisée pour les voies biosynthétiques et la synthèse des lipides. De récentes études suggèrent qu'une activité accrue de NRF2 dans les cellules tumorales entraîne une élévation du flux de carbone à travers le cycle TCA, conduisant à la production d'acétyl-CoA, qui, avec le NADPH, contribue à une augmentation de la biosynthèse des macromolécules³⁸⁷. Parmi les enzymes du cycle TCA régulées par NRF2, sont retrouvées les enzymes ME1 et IDH, toutes deux génératrices de NADPH. Afin de produire ce composé, l'enzyme mitochondriale ME1 convertit le malate en pyruvate, alors que l'enzyme cytosolique IDH1 transforme l'isocitrate en α -KG (figure 29). De plus, la pyruvate carboxylase, catalysant la carboxylation du pyruvate en oxaloacétate, a été identifiée comme gène cible potentiel de NRF2-MAFG^{387,550}.

5.3.4.2. Métabolisme de la glutamine

Acide aminé libre le plus abondant dans le sérum humain, la glutamine est un donneur d'azote clé et source de carbone pour le cycle TCA. De ce fait, les cellules proliférantes comme les cellules tumorales, en sont fortement dépendantes. Il a été démontré que le facteur de transcription NRF2 contrôle son absorption, son métabolisme ainsi que son devenir. Effectivement, NRF2 régule l'expression d'ATF4, protéine contrôlant l'expression du transporteur de la glutamine SLC1A5 (*Solute Carrier Family 1 Member 5*)⁵⁵¹ et de l'asparagine synthétase (ASNS) dont le rôle est de générer de l'asparagine et du glutamate à partir de l'aspartate et de la glutamine³⁹³. Par ailleurs, la glutaminase, métabolisant la glutamine en glutamate, a été décrite comme cible de NRF2^{387,552}.

Fournisseur du cycle TCA par la production d' α -KG, le glutamate est également l'un des trois constituants des acides aminés du glutathion ; NRF2 soutient donc la réponse anti-oxydante et la production de NADPH en contrôlant le métabolisme de la glutamine. L'inhibition du facteur NRF2 engendre une diminution sévère du flux de carbone de la glutamine vers la biosynthèse du glutathion⁵⁴⁷. Aussi, le glutamate est une molécule d'échange obligatoire pour le transporteur antiport de la cystéine régulé par NRF2, SLC7A11. La cystéine étant un

autre constituant acide-aminé du glutathion, la production de glutamate médiée par NRF2 peut donc favoriser ce métabolisme anti-oxydant en élevant le taux de cystéine intracellulaire³⁸⁷.

Pareillement, la glutamine et le glutamate sont des donneurs d'azote pour de nombreuses voies métaboliques clés. Par exemple, le glutamate fournit l'azote lors de l'étape de transamination dans la biosynthèse de la sérine, ce qui génère de la glycine et de la cystéine requises pour la production de glutathion³⁸⁷.

5.3.4.3. Métabolisme des lipides

Bien moins caractérisé, l'impact de NRF2 sur le métabolisme des lipides est pourtant avéré. Alors que ce facteur active la production de NADPH grâce à la régulation à la hausse de la voie PPP, de la ME1 et de l'IDH, il favorise également le maintien des taux cellulaires de NADPH en réprimant les mécanismes cellulaires consommant ce substrat³⁸⁷. La biosynthèse des lipides étant l'un des processus les plus consommateurs de NADPH, Nrf2 supprime à la fois les gènes de biosynthèse et de désaturation des lipides dans le foie de la souris, dont les enzymes *Fasn* et *Scd1*⁵⁵³. A l'inverse, dans le cas d'un régime alimentaire riche en lipides, la biosynthèse des lipides induite par des enzymes *Acly*, *Acc* et *Fasn*, est plus prononcée chez les souris *Nrf2*^{-/-}⁵⁵⁴. Ces études suggèrent donc que l'activation de la voie de signalisation Nrf2 dans le foie de souris réprime la lipogenèse⁵⁵⁵ et joue un rôle important dans la réponse anti-oxydante en augmentant la disponibilité de NADPH nécessaire à une réponse anti-oxydante³⁸⁷.

Par ailleurs, l'activation de NRF2 favorise l'oxydation des acides gras. En effet, l'invalidation par siRNA de NRF2 entraîne l'inhibition de l'expression des gènes impliqués dans ce processus, tels que *ACOX1* (*Acyl-CoA Oxydase 1*), *ACOX2*, *CPT1* et *CPT2*⁵⁵⁶. De même, l'activation de Nrf2 dans les cellules de poumon de souris engendre l'expression des gènes d'oxydation des acides gras et des lipases.

Ce phénomène d'oxydation a de multiples fonctions : la dégradation de molécules lipidiques endommagées, de sorte qu'elles ne sont pas utilisées pour la synthèse membranaire, mais aussi la production et le maintien du taux de NADPH requis pour la détoxification des ROS⁵⁵⁷.

En conclusion, le facteur NRF2 joue un rôle pléiotrope dans la progression tumorale, en impactant divers processus tels que la différenciation, la prolifération et la mort cellulaires, ainsi que diverses voies métaboliques. Il permet protéger également les cellules malignes contre un stress oxydatif, les xénobiotiques et les thérapies anti-tumorales⁵¹⁶.

OBJECTIFS

OBJECTIFS

Les cancers du sein triple négatifs (TNBC), qui représentent 15 à 20% des cancers du sein, ne sont pas admissibles aux thérapies ciblées disponibles et doivent être traités par chimiothérapie ²⁵⁴. Ces tumeurs, décrites comme hétérogènes, sont particulièrement agressives et couramment associées à un mauvais pronostic, leurs taux de rechute étant plus importants que ceux des autres sous-types de cancers du sein ²⁵⁷. De manière intéressante, la présence d'infiltrats immunitaires au sein de ces tumeurs, a récemment été corrélée à un meilleur pronostic, suggérant un rôle bénéfique du système immunitaire dans les cancers TNBC ^{254,258}.

Le récent succès des inhibiteurs d'*immune checkpoints* dans les pathologies tumorales solides et hématologiques, dont le but est de rétablir et stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale, encourage le développement de nouvelles stratégies immuno-thérapeutiques dans le cancer du sein. Certaines font l'objet d'essais cliniques pour ce type de tumeur, et notamment les inhibiteurs de l'axe PD-1/PD-L1 ^{254,258}. Toutefois, ces *immune checkpoints* non seulement régulent la réponse immunitaire, mais possèderaient également des fonctions intrinsèques (non immunologiques) favorisant la progression tumorale. Ils pourraient interférer dans la réponse aux chimiothérapies, favoriser les processus de migration et d'invasion, mais aussi moduler le métabolisme des cellules tumorales afin de les rendre plus agressives.

Notre laboratoire s'intéresse depuis quelques années au rôle de la protéine PD-L1, exprimée à la surface des cellules tumorales et ligand du récepteur lymphocytaire PD-1. Ainsi, ce travail de thèse consistait à déterminer les fonctions intrinsèques et les voies de signalisation modulées par la molécule PD-L1, pouvant contribuer au développement du cancer du sein. Nous nous sommes particulièrement intéressés au sous-type triple négatif.

Les objectifs de ce travail doctoral ont donc été, à partir de la lignée de cancer du sein triple négative MDA-MB-231 :

1) De générer un modèle cellulaire d'inactivation du gène *CD274* codant PD-L1, par technique d'édition du génome, afin d'étudier de manière spécifique sa fonctionnalité.

2) De caractériser l'impact de la protéine PD-L1 au niveau du phénotype et du transcriptome de ces cellules MDA-MB-231 *in vitro*, et de déterminer son influence sur la croissance tumorale *in vivo*.

3) De déterminer le rôle de PD-L1 au niveau du métabolisme cellulaire, l'axe PD-1/PD-L1 ayant été décrit comme contribuant à l'immuno-évasion tumorale suite à l'induction d'une compétition métabolique entre cellules cancéreuses et immunitaires.

4) De confronter *in silico* nos résultats obtenus *in vitro*, à partir de bases de données de patients atteints de cancer du sein.

MATÉRIEL
&
MÉTHODES

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Techniques de biologie cellulaire

1.1. Culture cellulaire et réactifs

1.1.1. Culture des lignées cellulaires

Tous les types cellulaires ont été cultivés sous atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ à 37°C. Les cellules épithéliales cancéreuses de sein MDA-MB-231 proviennent du laboratoire du Pr. Xuefen LE BOURHIS (Université de Lille, Nord de France). Ces cellules sont mises en culture en milieu *Minimum Essential Medium alpha* (MEM α) (Gibco®, Life Technologies) supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté, avec des antibiotiques [Pénicilline (100 unités/mL) et Streptomycine (100 µg/mL), Gibco®, Life Technologies], 0,1 mM d'acides aminés non essentiels (NEAA) et 1 mM de sodium pyruvate (Gibco®, Life Technologies).

Nous disposons au laboratoire d'autres lignées issues de tumeurs humaines (**Tableau 7**), telles que les MCF7 (DSMZ ACC-115), les A375 et K562, également utilisées lors de cette étude. Les cellules K-562 sont cultivées en milieu *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI1640) GlutaMAX™ (Gibco®, Life Technologies), dans lequel sont rajoutés 10 % (v/v) de SVF décomplémenté et des antibiotiques comme décrit précédemment. Les lignées A375 et MCF7 sont cultivées en milieu *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) GlutaMAX™ supplémenté avec 10 % (v/v) de SVF décomplémenté, avec des antibiotiques [Pénicilline (100 unités/mL) et Streptomycine (100 µg/mL)], 0,1 mM d'acides aminés non essentiels et 1 mM de sodium pyruvate.

Lignée	Morphologie	Origine
MDA-MB-231	Epithéliale	Sein ; dérivée d'un site métastatique pulmonaire
MCF7	Epithéliale	
A375	Epithéliale	Mélanome
K562	Lymphoblaste	Moëlle osseuse ; Leucémie myéloïde chronique

Tableau 7 : Récapitulatif des différentes lignées cellulaires utilisées dans le cadre de ce projet, leur type et origine.

1.1.2. Réactifs et conditions de traitements

Les conditions d'hypoxie ont été réalisées soit en cultivant les cellules dans un incubateur à 37°C, 1% O₂ et 5% CO₂, soit en traitant les cellules avec 200 µM de Cobalt (II) chlorure (CoCl₂) (Sigma-Aldrich), agent mimant l'état d'hypoxie, pendant 24 heures, sauf indication. L'inhibiteur du protéasome MG132 (Selleckchem) a été utilisé à une concentration de 20 µM pendant 3 heures. De même, des traitements d'une durée de 24 heures avec

l'inhibiteur de la N-glycosylation tunicamycine ou avec l'agent anti-oxydant N-acétylcystéine (*Sigma-Aldrich*) ont été réalisés aux concentrations de 1 et 5 µg/mL ou 1 mM, respectivement. Enfin, les conditions de stress oxydant ont été induites suite à un traitement avec de la menadione ou du tH₂O₂ aux temps et concentrations indiquées (*Sigma-Aldrich*).

1.2. Transfection cellulaire

Le protocole suivi est celui d'Amaxa Biosystems, utilisant l'électroporateur Nucleofector™ II (*Lonza*). 2x10⁶ cellules par transfection sont centrifugées 5 minutes à 800g et reprises dans 100 µL de solution de transfection [« *Cell Line Nucleofector™ Solution* »] supplée de la solution « *Supplement* » et de 2 µg de plasmide ; la solution de transfection utilisée varie selon la lignée cellulaire (*Lonza*). Après homogénéisation, la suspension cellulaire est transférée dans une cuve d'électroporation et la transfection est réalisée selon le programme optimisé par Amaxa pour chaque type cellulaire (voir **Tableau 8**). La suspension est ensuite reprise dans 500 µL de milieu de culture préalablement chauffé à 37°C, puis transférée en plaque 6 puits dans 3 mL de milieu de culture. Les cellules sont incubées de 24h à 72h avant analyse de l'efficacité de transfection par cytométrie en flux.

Afin de générer les modèles de surexpression de la protéine PD-L1, le plasmide codant l'isoforme 1 de PD-L1 (EX-U0767-M10) ou le vecteur contrôle (EX-NEG-M10) (*GeneCopoeia*) ont été transfectés selon le protocole décrit ci-dessus et la sélection à l'antibiotique a débuté 48 heures après transfection, aux concentrations indiquées pour chaque lignée dans le **Tableau 8**. Les cartes de ces vecteurs plasmidiques sont présentées en **Annexe 1**.

Lignée	Kit	Programme	[Néomycine]
MDA-MB-231	V	X-013	1200-1400 µg/mL
MCF7	V	P-020	800 µg/mL
A375	V	X-001	1200 µg/mL
K562	V	T-016	800 µg/mL

Tableau 8 : Récapitulatif des conditions de transfection (kit et programmes) et de sélection à la néomycine pour chaque lignée cellulaire.

1.3. Cytométrie en flux

Pour évaluer l'expression de surface de protéines membranaires, 500 000 cellules sont centrifugées à 800g pendant 5 minutes afin d'éliminer le surnageant, lavées une fois au *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (D-PBS) (*Gibco®*, *Life Technologies*) puis reprises dans 100 µL de D-PBS auxquels sont ajoutés 1 µL de *Fc block* humain (*Miltenyi Biotec*) et l'anticorps d'intérêt ou l'isotype correspondant, tous deux couplés à un fluorochrome. Les

conditions d'utilisation des différents anticorps sont indiquées dans le **Tableau 9**. Après 20 minutes d'incubation dans l'obscurité à 4°C, les cellules sont lavées au D-PBS puis resuspendues dans 400 µL de D-PBS. L'analyse est réalisée à l'aide du cytomètre analyseur CyAn ADP (*Beckman Coulter*). 10⁷ cellules sont utilisées pour un tri cellulaire ou la réalisation de plaques d'autoclones par le trieur FACS ARIA (*Becton Dickinson*). Le logiciel Summit 4.3 (*Beckman Coulter*) a été utilisé pour analyser les données.

Anticorps	Hôte	Immunogène	Concentration	Fournisseur
PD-L1 humain	Souris	Clone MIH1, couplé à phycoérythrine	0,15 µg/test	Thermo Fisher Scientific
Isotype IgG1κ	Souris	IgG1κ, couplé à phycoérythrine	0,15 µg/test	

Tableau 9: Récapitulatif des anticorps utilisés pour la cytométrie en flux, leur condition d'utilisation ainsi que le nom du fournisseur.

2. Techniques de biologie moléculaire

2.1. Invalidation de CD274 par technique d'édition du génome

L'établissement de la lignée humaine MDA-MB-231 *knock-out* pour le gène *CD274* codant la protéine PD-L1 a été réalisé en utilisant la stratégie d'édition du génome par les *Zinc Finger Nucleases* [*CompoZR Zinc Finger Nuclease (ZFN)*, kit CKOZFN5707] (*Sigma-Aldrich*) (**Annexe 2**). Les plasmides ZFN ont été transfectés selon le protocole décrit ci-dessus pour la lignée MDA-MB-231. Après 72 heures, temps nécessaire pour que la cassure double brin soit induite par les ZFN sur le gène *CD274* et la réparation homologue effectuée, les cellules *CD274/PD-L1*-négatives sont isolées à l'aide du trieur BD FACS Aria III (*Becton Dickinson*). Pour cela, les cellules ont été marquées au préalable avec un anticorps anti-*CD274/PD-L1* humain marqué PE (clone MIH1) ou avec un anticorps contrôle isotypique marqué PE (*Thermo Fisher Scientific*). A partir de ce *bulk* de cellules *CD274/PD-L1*-négatives, des clones cellulaires ont été isolés en plaques 96 puits en utilisant le module d'autoclone du trieur BD FACS Aria III. Chaque puits contient 100 µL de milieu conditionné pendant 24h et provenant de la culture de la lignée parentale, filtré sur membrane 40 µm (*Corning*). Les clones cellulaires ont été amplifiés après vérification au microscope Leica DMI1 (*Leica Microsystems*) de la présence d'une seule cellule par puits. Pour chaque clone cellulaire obtenu, la région de l'exon 3 du gène *CD274* ciblée par les ZFN a ensuite été séquencée par la méthode Sanger (GATC) et analysée grâce au logiciel Chromas® version 1.43 (*Technelysium Pty Ltd*). De cette manière, six clones contenant des mutations homozygotes à l'origine d'un décalage de la séquence de lecture ont été identifiés. L'invalidation a également été confirmée par Western-blot et cytométrie en flux.

Dans l'objectif d'étudier les fonctions de l'isoforme 1, deux clones cellulaires MDA-MB-231 *CD274-KO* ont été transfectés avec un plasmide vide contrôle ou avec le même plasmide codant l'isoforme 1 de la protéine PD-L1 (respectivement, EX-NEG-M10 et EX-U0767-M10 ; *GeneCopoeia*). Les cellules ont ensuite été sélectionnées avec de la néomycine à 1,2 mg/mL pendant 10 à 15 jours puis des clones cellulaires ont été isolés en plaques 96 puits comme décrit précédemment. L'intégration du plasmide vide a été validée par PCR, en utilisant des amorces spécifiques du gène de résistance à la néomycine (sens : 5'-CTTGGGTGGAGAGGCTATTC-3' ; anti-sens : 5'-AGGTGAGATGACAGGAGATC-3'). L'intégration du plasmide codant PD-L1 a été validée par Western-blot et cytométrie en flux. Pour chaque transfection, six clones cellulaires validés ont tout d'abord été mis en culture seuls, pour ensuite générer des *bulks* à partir de 10⁶ cellules de chaque clone. Ces *bulks* correspondent aux lignées cellulaires MDA-MB-231-VIDE (« VIDE ») et MDA-MB-231-PD-L1-iso1 (« PD-L1 »). Enfin, ces deux lignées ont été authentifiées par analyse STR (*Short Tandem Repeat*) réalisée par la société *LGC Standards (Teddington)*.

2.2. Amplification des plasmides

2.2.1. Transformation bactérienne

Dans le but d'obtenir des quantités importantes de plasmides, nécessaires pour générer des lignées cellulaires transfectées de manière stable, une transformation de bactéries compétentes *Escherichia coli* Top10 est réalisée (*Thermo Fisher Scientific*). Pour cela, 2 ng de plasmide purifié sont ajoutés à 100 µL de bactéries et incubés 20 minutes sur glace, suivi d'un choc thermique de 90 secondes à 42°C afin de perméabiliser les parois bactériennes et permettre la pénétration du plasmide. Après une incubation de 5 minutes sur glace, les bactéries sont cultivées en milieu SOC (*Invitrogen*) pendant 45 minutes à 37°C ; cela favorise l'expression de la cassette de résistance portée par le plasmide. 160 µL de cette solution bactérienne est étalée sur milieu Luria-Bertani gélosé (*LB Broth, Thermo Fisher Scientific*) avec 1,5% d'agar et contenant de l'ampicilline (50 µg/ml), puis incubée une nuit à 37°C. L'une des colonies bactériennes obtenues est ensuite mise en culture pendant 8 heures à 37°C et sous agitation à 125 rpm, dans du milieu LB/antibiotique.

2.2.2. Isolement et linéarisation des fragments d'ADN

La purification de l'ADN plasmidique est réalisée grâce au kit *Nucleobond® Xtra Midi (Macherey Nage)* selon les recommandations du fournisseur. Afin de faciliter l'intégration stable du vecteur dans les cellules après transfection, celui-ci doit être au préalable linéarisé. Pour cela, 20 µg de plasmide purifié sont digérés par 100 U d'enzyme *DraIII (New England Biolabs)*, 2 heures à 37°C. Après électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % contenant du

bromure d'éthidium, agent intercalant de l'ADN, la migration est faite dans du tampon TBE 1X (tris borate EDTA) pendant 40 minutes à 30 mV. Le produit de digestion correspondant au fragment d'ADN linéaire est ensuite excisé à l'aide d'un scalpel et l'ADN est purifié à l'aide du kit *PCR and Gel Extraction Kit (Macherey-Nagel)* puis dosé grâce au spectrophotomètre Nanodrop 1000 (*Thermo Fisher Scientific*).

2.3. Extraction de l'ADN génomique, PCR et séquençage

L'extraction de l'ADN génomique des culots cellulaires a été réalisée en utilisant le kit *Nucleospin Tissue (Macherey-Nagel)* selon les recommandations du fournisseur. Après dosage des ADNg au spectromètre Nanodrop 1000 (*Thermo Fisher Scientific*), 100 ng ont été utilisés par PCR. A l'ADNg sont ajoutés 12,5 µL de *KAPA HiFi HotStart Ready Mix 2X (KAPA Biosystems)* contenant l'enzyme KAPA HiFi (0,5 unité / 25 µL de réaction), les dNTP (0,6 mM), le tampon de réaction et le MgCl₂ (5 mM). A cette solution sont additionnés les amorces sens et anti-sens à 10 µM, ainsi que l'H₂O MilliQ pour obtenir un volume final de 25 µL. Afin de vérifier le *knock-out* du gène *CD274/PD-L1* par les *Zinc finger nucleases*, les amorces utilisées sont : 5'-CAGAGCTAGCAGGTGTTCCC-3' pour le sens et 5'-TGTTGATTCTCAGTGTGCTGG-3' pour l'anti-sens. Les différentes étapes de la PCR sont : 3 minutes à 95°C, puis 35 cycles comprenant chacun 20 secondes à 98°C, 15 secondes à 64°C et 30 secondes à 72°C ; enfin, 7 minutes à 72°C. Les produits de PCR sont ensuite purifiés grâce au kit *Nucleospin Gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel)* et séquencés (*société GATC Biotech*) à partir de l'amorce 5'-TTAAGCATATCCCTCTG-3'. Les séquences obtenues ont été analysées avec le logiciel ClustalW2 développé par l'EMBL-EBI (*European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute*).

Les régions *OFF-target* putatives des ZFN ont été vérifiées de la même manière, en utilisant les amorces pour PCR et séquençage détaillées dans en **Annexe 3**.

2.4. Extraction des ARN, synthèse des ADNc et Q-RT-PCR

2.4.1. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux provenant de lignées cellulaires ou de tumeurs issues de xéno greffes de souris sont purifiés selon le protocole du kit *Nucleospin RNA kit (Macherey-Nagel)*. Ils sont ensuite élués dans 60 µL de tampon d'éluion *Nucleases-free* et dosés par spectrométrie UV (Nanodrop 1000, *Thermo Fisher Scientific*).

2.4.2. Synthèse des ADNc

La synthèse des ADNc est réalisée par rétro-transcription à l'aide du kit *SuperScript VILO cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific)*. Une réaction se fait à partir de 2,5 µg d'ARN, auxquels sont ajoutés 4 µL de tampon *5X VILO Reaction Mix*, 2 µL d'enzyme *10X SuperScript Enzyme Mix* et le volume réactionnel final est ajusté à 20 µL avec de l'eau DEPC-traitée (diéthyl pyrocarbonate). La réaction de rétro-transcription est réalisée sur thermocycleur Veriti (*Applied Biosystems*) selon le protocole suivant : 10 minutes à 25°C, 60 minutes à 42°C puis 5 minutes à 85°C. Les échantillons d'ADNc sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation pour les réactions de Q-RT-PCR.

2.4.3. Q-RT-PCR

La méthode de quantification par chimie SYBR Green (*Applied Biosystems*) a été utilisée afin de mesurer les transcrits de différents gènes. L'analyse est effectuée en plaque 96 puits, en triplicat, à l'aide de l'appareil *ABI StepOnePlus apparatus (Applied Biosystems)*. Chaque puits contient 20 ng d'ARN équivalent ADNc, 1 µM de chaque amorce sens et anti-sens (**Tableau 10**), l'agent *SYBR Green Master Mix* à une concentration 1X (*Applied Biosystems*), complété par un volume d'H₂O stérile *RNase/DNase free* afin d'atteindre un volume final de 20 µL. Les réactions de Q-RT-PCR ont été réalisées en utilisant le protocole standard du logiciel *StepOne Software (Applied Biosystems)* : 15 minutes à 95°C, suivies par 35 cycles de 15 secondes chacun à 95°C puis une étape de 1 minutes à 60°C et enfin, une étape d'élévation de la température de 60 à 95°C afin de déterminer la courbe de dissociation, permettant d'observer un pic unique confirmant la présence d'un seul ampligène. Le gène de référence utilisé est la *GAPDH*. Chaque matrice est analysée en triplicat sur chaque plaque avec 1 puits témoin ne contenant pas d'ADNc. Chaque expérience est réalisée au minimum 3 fois. Le Ct (*cycle at threshold*) obtenu correspond à la valeur de cycles à laquelle le signal de la sonde se détache du bruit de fond. L'expression relative des ARNm est ensuite déterminée selon la méthode $\Delta\Delta CT$.

	Amorces sens (5'-3')	Amorces anti-sens (5'-3')
PRX3	TTAAACATGGTTAGTTGCTAGTACAAGGA	TTGAGACATGATCTAAGAATAGCCTTCTA
GSTM3	CCTGGATGGGAAGAACAAGA	TTGTGTGCGGAAATCCATTA
NQO2	GAAACCCACGAAGCCTACA	CAGCACCTATCCATCCAG
ABCC2	ACAGAGGCTGGTGGCAACC	ACCATTACCTTGTCCTGTCCATGA
HIF1a	GAAAGCGCAAGTCTTCAAAG	TGGGTAGGAGATGGAGATGC
LDHA	AGCCCGATTCCGTTACCT	CACCAGCAACATTCATTCCA
PDHK1	CGGATCAGAAACCGACACA	ACTGAACATTCTGGCTGGTGA
GLUT1	AACTTTCAGCCAGGGTCCAC	CACAGTGAAGATGATGAAGAC
GLUT3	TTCAAGAGCCCATCTATGCC	GGTCTCAGGGACTTTGAAGA
GAPDH	ACCCACTCCTCCACCTTTGA	CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT

Tableau 10: Récapitulatif des primers sens et anti-sens utilisés lors des réactions de Q-RT-PCR par chimie SYBR Green, pour chaque gène indiqué.

3. Techniques de biochimie

3.1. Extraction et dosage de protéines

Des culots secs de cellules ont été réalisés après centrifugation 5 minutes à 800g. Pour extraire les protéines totales, 10 millions de cellules sont lysées avec 150 µL de tampon M-PER (kit *M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent*, Thermo Fisher Scientific) en présence d'un mélange d'inhibiteurs de protéases (*cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, Sigma-Aldrich) et d'inhibiteurs de phosphatases (*Phosphatase Inhibitor Cocktail B and C*, Santa Cruz). Ces extraits cellulaires sont ensuite purifiés par centrifugation à 14 000g pendant 15 minutes à 4°C. Afin d'étudier la localisation sub-cellulaire de différentes protéines, les extractions de protéines spécifiques de compartiment ont été réalisées selon les recommandations du fournisseur en utilisant le kit *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* pour les protéines cytoplasmiques et nucléaires (Thermo Fisher Scientific). Brièvement, pour l'extraction des protéines nucléaires et cytoplasmiques, des culots secs de 8×10^6 cellules sont resuspendus avec 200 µL de tampon CER I, vortexés pendant 15 secondes et incubés sur glace 10 minutes. Après ajout de 11 µL de tampon CER II, la suspension est vortexée 5 secondes puis incubée 1 minute sur glace avant d'être centrifugée 5 minutes à 16 000g. Ces deux premiers réactifs provoquent une rupture de la membrane cellulaire et la libération des protéines cytoplasmiques. Le surnageant obtenu, correspondant donc à la fraction cytoplasmique, est conservé jusqu'à utilisation à -80°C. Afin d'éviter au maximum une contamination cytoplasmique de la fraction nucléaire, le culot contenant les noyaux est lavé avec 100 µL de tampon CER I et centrifugé 15 secondes à vitesse maximale pour faire sédimenter les noyaux. Cette opération est réalisée 3 fois. Le culot nucléaire est ensuite repris dans 100 µL de tampon de lyse des noyaux NER, vortexé vigoureusement pendant 15 secondes puis incubé 40 minutes sur glace en vortexant toutes les 10 minutes. Enfin, après une centrifugation à 16 000g pendant 10 minutes, le surnageant correspondant aux extraits nucléaires est récupéré et conservé à -80°C. Les protéines sont ensuite dosées selon la méthode de Bradford (kit *BCA Protein Assay*, Thermo Fisher Scientific) en réalisant une gamme étalon de concentration croissante en BSA (*Bovine Serum Albumine*).

3.2. Western-blot

20 µg de protéines par échantillon sont dénaturées en les portant à 95°C pendant 10 minutes en bleu Laemmli/tampon M-PER volume/volume. Puis la séparation des protéines est réalisée sur gel Nu-PAGE pré-coulé Bis-Tris 4-12% (Thermo Fisher Scientific) pendant 45 minutes à 200 mV dans du tampon de migration MES (*SDS Running Buffer NuPAGE® MES*,

[Matériel et Méthodes]

Thermo Fisher Scientific). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose grâce au système de transfert sec *iBlot* (*Thermo Fisher Scientific*) pendant 8 minutes. La membrane est ensuite incubée une heure en tampon de saturation [TBS 1X ; 0,2% Tween-20 (*Sigma-Aldrich*) ; 5% BSA ou 5% lait (*Santa Cruz*), selon l'anticorps primaire utilisé par la suite] puis avec l'anticorps primaire en solution dans le tampon de saturation pendant une nuit à 4°C. Après trois lavages en TBS-1% Tween-20 de 10 minutes chacun, la membrane est incubée une heure avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase, en solution dans le tampon de saturation, puis lavée en TBS-0,2% Tween-20 pendant 5 minutes trois fois. Les dilutions des anticorps primaires et secondaires sont indiquées dans le **Tableau 11**. La révélation est réalisée par chimio-luminescence. La membrane est mise en présence du substrat de la peroxydase à l'aide du réactif *Amersham ECL Primer Western Blotting System* (*GE Healthcare Europe*) pour les protéines d'intérêt et le *Western Pico* (*Thermo Fisher Scientific*) pour les témoins de charge. Après 5 minutes d'incubation dans l'obscurité, la révélation est faite avec le LAS 4000 (*GE Healthcare*). L'analyse des images est réalisée grâce au logiciel ImageQuantTL. La membrane peut être conservée dans du TBS à 4°C ou déshybridée. Pour cela, elle est lavée en TBS-2% Tween-20 5 minutes, puis 10 minutes dans du *stripping buffer* (*Gene Bio-Application Ltd*) sous forte agitation. Après quatre rinçages avec de l'H₂O MilliQ, le protocole de saturation et d'incubation avec les anticorps peut recommencer.

Cible	Mono- ou polyclonal ?	Hôte	Clone ou référence	Dilution	Fournisseur
Anticorps primaires – Protéines d'intérêt					
PD-L1	mono	Lapin	E1L3N	1/1000 ^e	CST
NRF2	poly	Lapin	C-20	1/1000 ^e	SC
p53 totale	mono	Lapin	7F5	1/2000 ^e	CST
p53-Ser6	mono	Lapin	#9285	1/1000 ^e	CST
NQO2	poly	Lapin	#HPA021332	1/500 ^e	AB
GSTM3	poly	Lapin	#HPA035190	1/500 ^e	AB
SOD2	poly	Lapin	FL-222	1/1000 ^e	SC
PRX3	mono	Souris	12B	1/1000 ^e	SC
HIF-1 α	mono	Lapin	D2U3T	1/1000 ^e	CST
Anticorps primaires – Témoins de charge					
GAPDH	poly	Souris	FL-335	1/1000 ^e	SC
β -Actine	mono	Souris	AC-15	1/1000 ^e	Sigma
Lamine B2	mono	Lapin	E1S1Q	1/1000 ^e	CST

Tableau 11: Récapitulatif de l'ensemble des anticorps utilisés dans notre étude.
 CST : Cell Signaling Technology ; SC : Santa Cruz ; AB : Atlas antibodies ; Sigma : Sigma-Aldrich

3.3. Immunofluorescence

5×10^3 cellules adhérentes sontensemencées dans chacune des 8 chambres de la lame Lab-tek (*Becton Dickinson*) et cultivées en condition basale comme décrit précédemment (**Matériel et Méthodes, chapitre 1.1.1.**), ou traitées pendant 3 heures avec $100 \mu\text{M}$ de ménadione ou pendant 16 heures avec $500 \mu\text{M}$ de tH_2O_2 , selon l'expérience réalisée. Dans le cas des cellules en suspension K562, 100 000 cellules sont centrifugées sur une lame de verre au Cytospin (Thermo Cytospin 2, *Thermo Fisher Scientific*) à 350 rpm pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite lavées au D-PBS froid et fixées avec une solution de paraformaldehyde 4% pendant 20 minutes ou de méthanol/acétone (1/1) froid pendant 5 minutes pour le marquage de NRF2 ou PD-L1, respectivement. La perméabilisation des cellules et la saturation sont réalisées après à un traitement d'une heure à température ambiante (TA) en chambre humide avec une solution de 0,5% Triton X-100 - 5% de sérum de chèvre ou une solution de 2% BSA/D-PBS pour NRF2 ou PD-L1, respectivement. Les cellules sont ensuite incubées une nuit à 4°C avec un anticorps dirigé contre NRF2 (clone C-20) ou PD-L1 (clone D8T4X) (*Cell Signaling Technology*) dilué dans du tampon de saturation. Après deux lavages au D-PBS, les cellules sont incubées pendant 1 heure à TA avec un anticorps secondaire conjugué à l'Alexa Fluor 594 (*Molecular Probes, Invitrogen*). Enfin, une lamelle est montée sur la lame à l'aide du Vectashield contenant le marqueur nucléaire DAPI (*Vectashield plus DAPI, Vector Labs*), puis les observations microscopiques sont réalisées à partir du confocal Zeiss 710 de la plateforme d'imagerie cellulaire du BiCeL. L'intensité de fluorescence a été mesurée grâce au logiciel d'analyse ImageJ (*NIH Image*).

4. Techniques de biologie fonctionnelle

4.1. Evaluation de la croissance cellulaire

4.1.1. Analyse par comptages

Les cellules ont été ensemencées en boîtes 100 mm à une concentration de 5×10^4 cellules/boîte et comptées à l'aide de l'automate *Z2 Coulter Particle Count and Size Analyzer* (*Beckman Coulter*) après 3, 4 et 6 jours de culture en milieu complet.

4.1.2. Tests de clonogénéité

Afin d'évaluer leur capacité de clonogénéité, les cellules MDA-MB-231 « PD-L1 » et « VIDE » ont été ensemencées en plaque 6 puits à une concentration de 200 cellules par puits, puis cultivées en condition basale (normoxie) ou en condition hypoxique soit avec un traitement à $200 \mu\text{M}$ de CoCl_2 , agent mimant l'hypoxie, soit dans un incubateur humide à

37°C, 1% O₂ et 5% CO₂ pendant 10 jours. Après rinçage au D-PBS, les colonies formées sont ensuite révélées après un marquage de 10 minutes au crystal violet (*Sigma-Aldrich*).

4.1.3. Culture 3D

La culture 3D des cellules cancéreuses de sein MDA-MB-231 a été réalisée en plaque 24 puits. Pour cela, les puits ont été *coatés* avec une solution de D-PBS/Matrigel (7,5 mg/mL) sur une épaisseur de 1 à 2 mm. Les cellules, reprises dans du milieu complet (**Matériel et Méthodes, chapitre 1.1.1.**) avec 2% de matrigel, ont ensuite étéensemencées à une concentration de 8x10³ cellules par puits. Le milieu/2% matrigel a été remplacé tous les 4 jours. Après 10 jours de culture, les colonies cellulaires formées ont été photographiées au microscope Leica DMI1 (*Leica Microsystems*).

4.2. Analyse de l'apoptose

L'apoptose des MDA-MB-231 "PD-L1" et "VIDE" a été analysée par test Annexine V/IP après 24 heures de culture en condition basale. Brièvement, 2,5x10⁵ cellules ont été lavées avec du D-PBS à 4°C puis resuspendues dans 100 µl de *Binding Buffer 1X* auxquels sont ajoutés 5 µL/réaction d'Iodure de Propidium et 3 µL/réaction d'Annexine V conjuguée à la fluorescéine-5-isothiocyanate (FITC) (*Beckman Coulter*). Après incubation pendant 20 minutes sur glace à l'obscurité, 400 µL de *Binding Buffer* sont ensuite ajoutés dans chaque tube et l'analyse est réalisée sur cytomètre CyAn ADP (*Beckman Coulter*). Les données sont interprétées grâce au logiciel Summit v4.3 (*Beckman Coulter*). Les cellules négatives pour l'Annexine V et l'IP sont considérées comme vivantes ; celles positives pour l'Annexine V et négatives pour l'IP sont en apoptose précoce, et les cellules doubles positives Annexine V⁺ et IP⁺ sont considérées comme étant dans un état d'apoptose tardive.

4.3. Analyse du cycle cellulaire

Pour l'étude du cycle cellulaire, les cellules sontensemencées en plaque 6 puits à une concentration de 5x10⁵ cellules/puits, cultivées dans du milieu complet pendant 24 heures, puis lavées deux fois au D-PBS avant d'être fixées avec de l'éthanol 70% froid (à une température de -20°C), et conservées à -20°C jusqu'à analyse. Les cellules sont ensuite marquées avec une solution de D-PBS contenant 50 µg/mL d'Iodure de Propidium et 5 µg/mL de RNase. La fluorescence a été mesurée à l'aide du cytomètre CyAn ADP (*Beckman Coulter*) et le logiciel Summit v4.3 (*Beckman Coulter*) a été utilisé afin d'estimer les pourcentages des cellules en phases G1, S et G2/M du cycle.

4.4. Détermination de la production de ROS

La sonde *MitoSOX Red* a été utilisée afin d'évaluer la production de ROS mitochondriales (*Molecular Probes, Invitrogen*). Pour cela, après avoir atteint 80% de confluence, les cellules ont été marquées avec 5 μM de *MitoSOX* dilué dans du D-PBS. Après une incubation de 20 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière, la fluorescence a été déterminée à l'aide du cytomètre CyAn ADP (*Beckman Coulter*).

4.5. Evaluation du métabolisme

4.5.1. Analyses par méthode Seahorse®

La bioénergétique des cellules, incluant le taux de consommation en Oxygène (OCR, *Oxygen Consumption Rate*) et le taux d'acidification extracellulaire (ECAR, *Extracellular Acidification Rate*) a été évaluée par le *Seahorse Bioscience XF-24 ExtracellularFlux Analyzer* (*Seahorse Bioscience*). Le jour précédent l'analyse, les cartouches équipées de sondes sensibles au pH et au taux d'oxygène ont été pré-incubées avec une solution de calibration, à raison de 1 mL par puits, à 37°C dans un incubateur sans CO₂. De plus, les cellules ont étéensemencées en plaque Seahorse 24 puits à une concentration de 2,5x10⁴ cellules par puits pour les lignées MDA-MB-231 et MCF7, et 3,5x10⁴ cellules par puits pour la lignée A375. Une heure avant la mesure, le milieu de culture a été remplacé par du milieu d'analyse contenant 2 mM de L-glutamine et préparé selon les recommandations du fournisseur, pour évaluer l'ECAR et supplémenté de 10 mM de D-glucose et 1 mM de pyruvate pour l'OCR. Après 15 minutes d'incubation minimum dans l'incubateur sans CO₂, l'ECAR et l'OCR ont été mesurées selon le protocole de référence à différents temps et après injection d'inhibiteurs aux concentrations finales de 1 μM oligomycine, 0,25-0,5 μM FCCP, 1 μM rotenone et 1 μM antimycine A pour l'OCR, ainsi que 10 mM D-Glucose, 1 μM oligomycine et 100 mM 2-Deoxy-D-Glucose (2-DG) pour l'ECAR.

4.5.2. Dosages du glucose et lactate

La consommation de glucose et la production de lactate ont été mesurées à partir de surnageants de 24 heures de culture, par le *SYNCHRONLX20 Clinical system* (*Beckman Coulter*).

5. Manipulations *in vivo* : Xénogreffe

L'impact de PD-L1 sur la croissance tumorale a été déterminé après injection sous-cutanée de 10⁶ cellules MDA-MB-231 « PD-L1 » ou « VIDE », resuspendues dans 200 μL de

solution D-PBS/Matrigel (*Corning*) (v/v), au niveau du flanc droit de souris athymiques *Nude* femelles Crl:NU(NCr)-Foxn1^{nu} (*Charles River Laboratories*) âgées de 8 semaines. Dès que les tumeurs sont palpables, la croissance des tumeurs est mesurée tous les 3 à 4 jours par la technique de mesure de Vernier à l'aide d'un pied à coulisse. Le volume tumoral est calculé selon la formule : volume (mm³) = 0,5 x largeur² x longueur, où la largeur et la longueur correspondent respectivement aux plus petite et grande mesures. Lorsque les tumeurs atteignent un volume de 2000 mm³, les souris sont sacrifiées et les tumeurs prélevées. Ces tumeurs sont soit conservées à -80°C dans du *RNA Later* (*Thermo Fisher Scientific*) pour des extractions d'ARN ultérieures, soit dilacérées mécaniquement puis enzymatiquement à la collagénase de type II (*Thermo Fisher Scientific*) pour ensuite mettre les cellules en culture dans du milieu complet. Les données ont été obtenues à partir de 8 souris par groupe, et l'expérience a été réalisée à trois reprises.

6. Etudes “omics”

6.1. Etude métabolomique

Afin de réaliser l'étude métabolomique, les cellules ont étéensemencées en plaque 6 puits à une concentration de 5x10⁵ cellules/puits et cultivées pendant 24 heures dans du milieu DMEM sans glucose, contenant 10% (v/v) de SVF décomplémenté, 100 unités/mL pénicilline, 100 µg/mL streptomycine, 1 mM sodium pyruvate, 0,1 mM acides aminés non essentiels (*Gibco*®, *Life Technologies*) et supplémenté de 10 mM [U-¹³C₆] ou [U-¹²C₆] glucose. Les cellules sont ensuite centrifugées à 2000 rpm à 4°C pendant 5 minutes, lavées avec 2 mL de NaCl 0,9% à une température de 4°C, puis centrifugées à nouveau avant d'être resuspendues avec 250 µL de solution froide de Méthanol / Acetonitrile 10 mM / Tris-HCl à pH 9,4 (50:30:20, v/v/v). Après 3 minutes d'incubation sur glace, les cellules sont centrifugées à 20 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants obtenus ont été utilisés pour la détermination du profil métabolomique, réalisée par la plateforme *VIB Metabolomics Core* de l'Université KU Leuven. Les culots ont quant à eux servis à normaliser les données, après extraction des protéines totales et dosage BCA.

6.2. Analyses du kinome et du transcriptome

Les cellules MDA-MB-231 « PD-L1 » et « VIDE » ont été cultivées en milieu complet pendant 24 heures, puis centrifugées à 1200 rpm pendant 5 minutes afin d'obtenir un culot cellulaire. Quatre culots de chaque lignée, correspondants à 4 temps différents de culture, ont ensuite été envoyés à la société *Full Moon BioSystems* ou à la plateforme de génomique de Lille 2 pour l'analyse respective du kinome ou du transcriptome sur puce Affymetrix. Les

données de transcriptome sont disponibles sur la plateforme *NCBI Gene Expression Omnibus* (GEO), au numéro d'accèsion GSE100824. Une analyse plus détaillée du transcriptome a ensuite été réalisée à partir du logiciel *Ingenuity Pathway Analysis* (*Ingenuity Systems*).

7. Analyses *in silico*

7.1. Recherche de protéines tronquées potentiellement générées après l'édition du génome

En plus de la rupture nucléotidique du gène *CD274/PD-L1* générée suite à l'utilisation des *Zinc Finger Nucleases*, signifiant une perturbation de sa structure, nous avons voulu nous assurer qu'aucune protéine potentiellement nouvellement codée et fonctionnelle n'était produite. Nous avons réalisé cette vérification pour les deux clones cellulaires MDA-MB-231 *CD274-KO* 2 et 36, utilisés pour la génération des lignées « VIDE » et « PD-L1 ». Pour cela, nous avons utilisé le logiciel ExpASy (*Swiss Institute of Bioinformatics*) afin de convertir, à partir du codon ATG initiateur de l'ARNm *CD274/PD-L1*, les séquences nucléotidiques nouvellement générées en acides aminés. Afin de déterminer si des motifs protéiques fonctionnels avaient été créés, nous avons analysé les séquences peptidiques obtenues en les comparant à la base de données du NCBI BLASTp (*Basic Local Alignment Search Tool Protein*).

7.2. Analyses de bases de données de patients atteints de cancer du sein

Des bases de données *microarray* concernant des échantillons issus de patients atteints de cancer du sein ont été sélectionnées à partir de la plateforme *NCBI Gene Expression Omnibus* (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Les trois bases de données choisies possèdent des résultats de transcriptome de plus de 150 échantillons, obtenus après analyse Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 et normalisées selon l'algorithme RMA (*Robust Multi-array Average algorithm*). Leurs numéros d'accèsion sont les suivants : GSE20685⁵⁵⁸ (327 échantillons), GSE21653⁵⁵⁹ (266 échantillons) et GSE65216⁵⁶⁰ (153 échantillons). Pour chaque base de données, nous avons calculé les coefficients de corrélation Pearson pour chaque paire de gènes, incluant toujours *PD-L1/CD274*, ainsi que les p-values associées. Les sondes 227458_at, 220989_at, 200650_s_at, 201250_s_at, 202497_x_at, 206686_at, 1567013_at, 215223_s_at, 203665_at, 235867_at, 203922_s_at, 219773_at et 200736_s_at ont été respectivement utilisées pour les gènes *PD-L1/CD274*, *HIF-1 α* , *LDHA*, *SLC2A1/GLUT1*, *SLC2A3/GLUT3*, *PDHK1*, *NFE2L2*, *SOD2*, *HMOX1*, *GSTM3*, *CYBB*, *NOX4* et *GPX1*.

RÉSULTATS

RÉSULTATS

PARTIE I. Génération des modèles cellulaires d'étude

1. Invalidation de *CD274* par édition du génome dans les cellules MDA-MB-231

1.1. Invalidation du gène *CD274* et obtention de clones cellulaires *KO*

Afin d'étudier la fonctionnalité de la protéine PD-L1, nous avons entrepris de générer des lignées cellulaires *knock-out* (*KO*) pour le gène *CD274* codant cette protéine, par stratégie d'édition du génome. Celle-ci présente divers avantages : en plus de rompre de manière irréversible la structure du gène alors invalidé suite à l'induction de mutations par délétion ou insertion dans la région ciblée, elle ne nécessite pas d'intégration stable de matériel génique. De ce fait, la protéine codée par le gène ciblé et invalidé n'est plus exprimée, ou à défaut, des peptides inactifs sont générés. L'explication détaillée du principe de cette technique figure en **Annexe 2**. Nous avons utilisé la technologie des *Zinc Finger Nucleases* (ZFN) grâce au kit *CompoZR Knockout Zinc Finger Nucleases®* (Sigma-Aldrich). Même si l'efficacité des ZFN dépend de la lignée cellulaire d'étude, l'obtention de clones cellulaires *KO* pour le gène cible est un évènement rare, d'environ 1%, en moyenne.

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la lignée humaine cancéreuse de sein MDA-MB-231, décrite comme exprimant la protéine PD-L1 de façon importante en surface²³⁶. La **Figure 30A** confirme l'expression de surface élevée de PD-L1 dans cette lignée. La stratégie d'invalidation du gène *CD274* codant PD-L1 a donc été de transfecter les plasmides pour l'expression des ZFN puis de trier par cytométrie en flux les cellules n'exprimant plus la protéine PD-L1 en surface. Ces cellules seraient potentiellement *KO* pour ce gène. Ainsi, 72 heures après transfection des cellules MDA-MB-231 par les plasmides codant les ZFN, nous observons en **Figure 30A** une double population cellulaire caractérisée par la présence de cellules PD-L1-positives, représentant 90% de la population totale, et d'une population PD-L1-négative d'environ 10%. Nous avons trié cette dernière population afin d'obtenir un « *bulk* » de cellules à priori *KO* pour le gène *CD274* et de ce fait, n'exprimant plus la protéine PD-L1 (**Figure 30A**). Après avoir vérifié la stabilité de ce « *bulk* » de cellules *KO* pendant deux semaines de culture, nous avons cloné ces cellules. Le *KO* du gène *CD274* au sein des clones obtenus a ensuite été évalué par cytométrie en flux, par séquençage de la région du génome ciblée par les ZFN (après l'avoir amplifiée par PCR) et par Western-blot. La **Figure 30B** confirme l'absence d'expression de surface de la protéine PD-L1 dans les 12

clones présentés en comparaison à la population de cellules MDA-MB-231 *Wild-type* (WT) (Figure 30A).

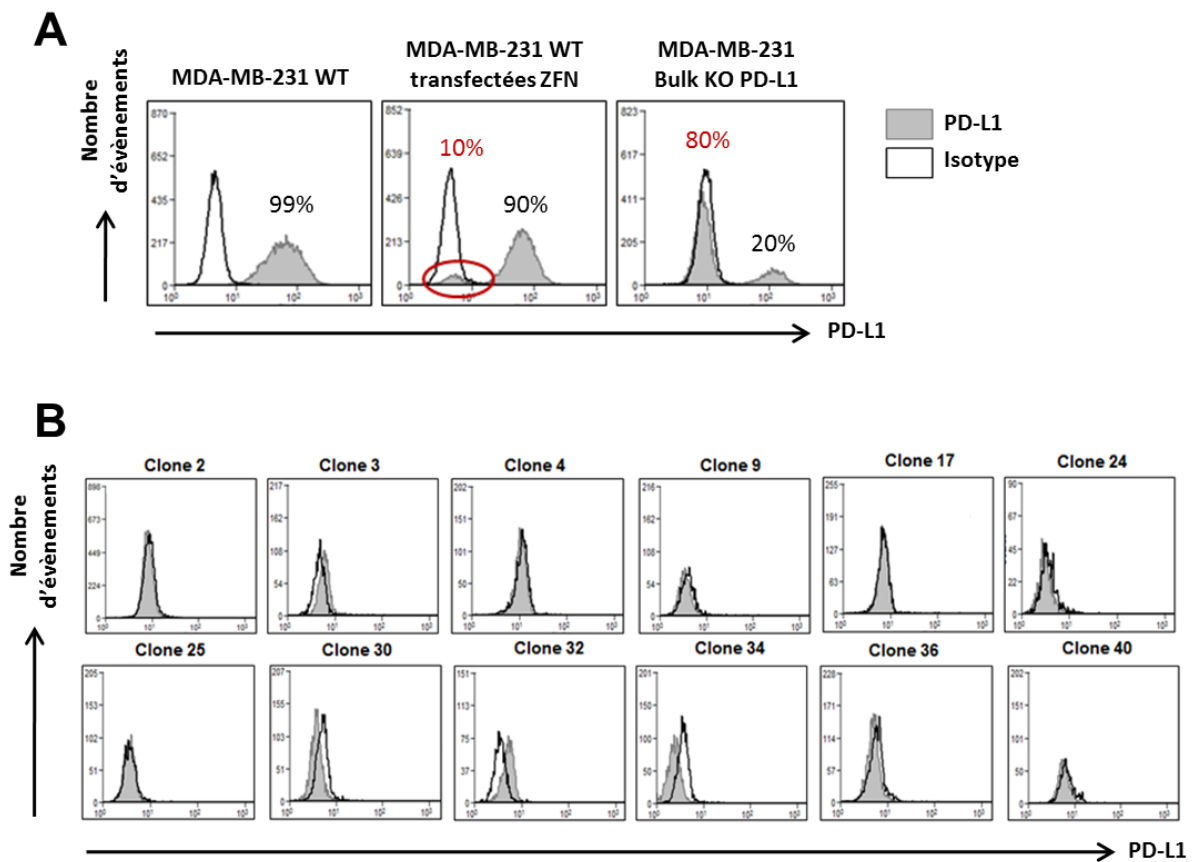


Figure 30: Analyse de l'expression de surface de PD-L1 lors de la mise en place de la technique d'édition du génome. A) Expression de surface de PD-L1 dans la lignée MDA-MB-231 lors des différentes étapes de la génération du knock-out pour le gène CD274. **B)** Expression de surface de PD-L1 des clones cellulaires de MDA-MB-231 KO pour le gène CD274 ; analysée par cytométrie en flux.

Un séquençage Sanger a ensuite été réalisé afin de vérifier l'introduction d'une mutation avec décalage du cadre de lecture dans la séquence du gène *CD274* de ces différents clones cellulaires. Ces mutations, mettant en jeu un nombre de nucléotides non multiple de trois, induisent une modification du cadre de lecture du gène, de manière à ce que la ré-expression de la protéine sauvage ne puisse être induite. En effet, un décalage du cadre de lecture de 3 ou d'un multiple de 3 nucléotides conserverait la séquence protéique intacte, en n'introduisant qu'une mutation localisée. D'autre part, nous avons vérifié le caractère homozygote des mutations, la ré-expression de PD-L1 pouvant avoir lieu dans le cas de mutations hétérozygotes. Parmi les clones cellulaires obtenus et suite à l'analyse des chromatogrammes, nous avons donc retenu ceux présentant des mutations homozygotes par insertion ou délétion au niveau de la région ciblée par les ZFN, par rapport au gène *CD274* de la population mère (ou WT) (Figure 31A). Ainsi, les clones 2 et 36 présentent une insertion de

4 nucléotides (nt), le clone 4 une délétion de 2 nt, le clone 30 une délétion de 5 nt et le clone 32 une insertion d'un nt ainsi qu'une délétion de 3 nt. Il est intéressant de noter que certains clones possèdent les mêmes mutations (**Figure 31A**). L'absence d'expression de PD-L1 a également été confirmée par Western-blot, par exemple pour les clones -2, -4, -30, -32 et -36 (**Figure 31B**).

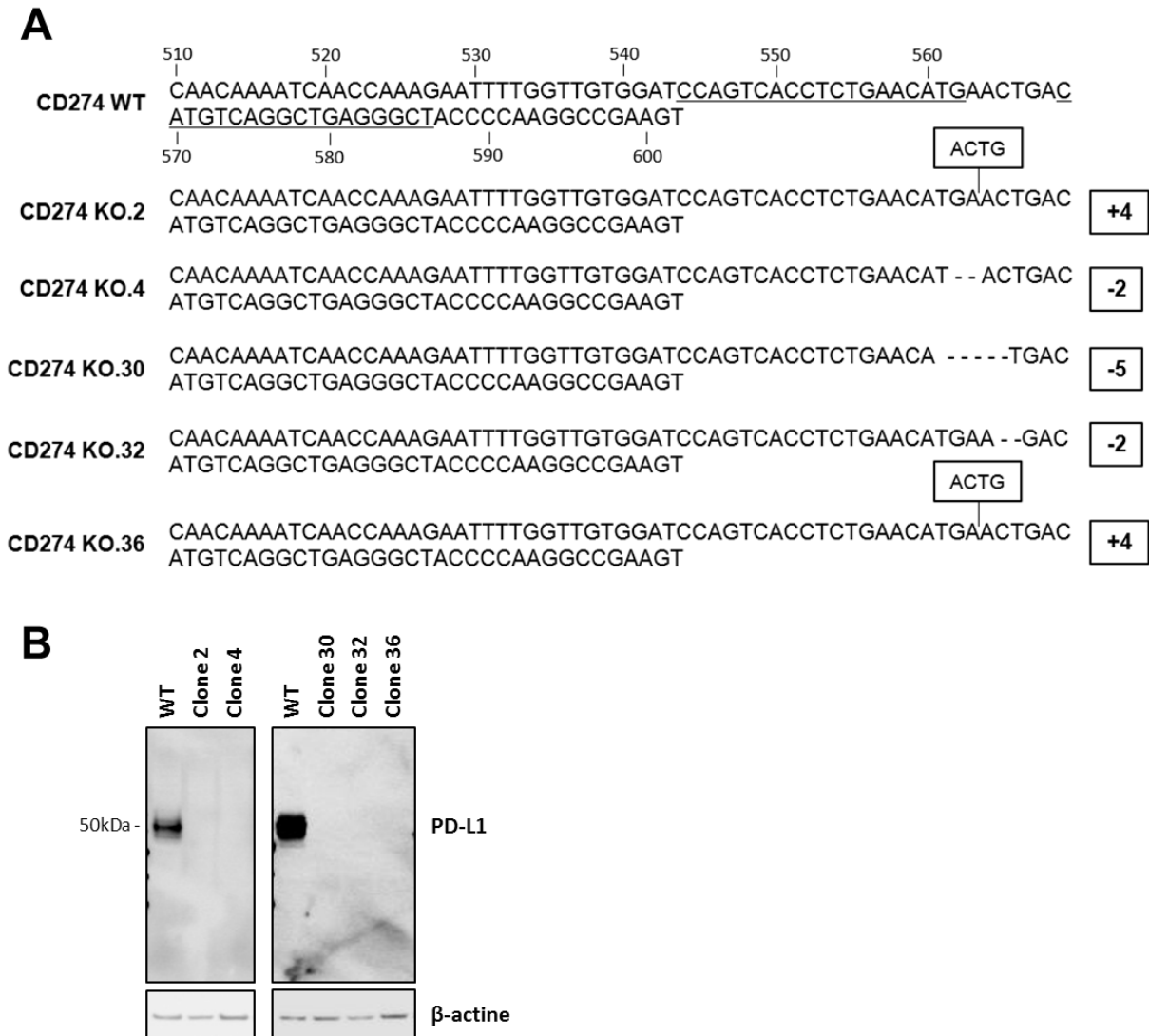


Figure 31: Mutation du gène CD274 dans les clones cellulaires obtenus et validation de la perte d'expression de PD-L1. **A)** Séquence de la région du gène CD274 ciblée par les ZFN pour les clones cellulaires KO de MDA-MB-231. Une PCR a été réalisée sur les ADNg des clones cellulaires MDA-MB-231 KO pour le gène CD274, au niveau de la région ciblée par les ZFN. Les sites de liaison des ZFN correspondent aux nucléotides soulignés. Les amplicons ont été séquencés afin de vérifier la présence de mutations. La numérotation des nucléotides se réfère au site [+1] de la transcription. Le codon initiateur ATG de la traduction est situé en position [+109]. **B)** L'expression de PD-L1 a été analysée par Western-blot pour 5 des clones CD274-KO. La β -actine est utilisée comme témoin de charge.

Les *Zinc Finger Nucleases* sont générés afin de maximiser leur spécificité d'action au niveau de la séquence d'ADN cible tout en évitant des effets indésirables en clivant d'autres régions du génome. Les ZFN ciblant le gène *CD274* et produits par la société Sigma-Aldrich ont ainsi été conçus pour qu'il y ait au minimum 7 différences nucléotidiques (*mismatches*) entre la région ciblée de *CD274* et les autres régions du génome proches, appelées « *OFF-targets* » et dont la liste nous a été fournie par le fournisseur. Afin de valider totalement ces 5 clones *CD274-KO*, nous avons vérifié par séquençage Sanger que les *OFF-targets* potentiels présentant 7 à 9 *mismatches* n'ont pas été clivés par les ZFN (**Annexe 3**, localisation de ces sites dans le génome humain et séquences des amorces utilisées). Pour les 5 clones *CD274-KO* obtenus, les séquences *OFF-targets* potentielles n'ont pas subi de mutations suite à l'action des ZFN.

D'autre part, pour chacun de ces clones *CD274-KO*, nous avons voulu nous assurer qu'aucune nouvelle protéine potentiellement fonctionnelle n'était produite à partir des séquences nucléotidiques modifiées. Effectivement, la région ciblée par les ZFN se situe au niveau de l'exon 3 de la séquence du gène *CD274* codant le début du domaine IgC₂ de PD-L1, commun aux trois isoformes protéiques. Plus précisément, et si on convertit au niveau de la séquence protéique de PD-L1, sont ciblés les acides aminés PVTSEHELTCQAEGY, soit les AA146 à 160 des isoformes 1 et 3, et les AA32 à 46 de l'isoforme 2 de PD-L1. Ainsi, une protéine fusionnant les premiers acides aminés de PD-L1 à une nouvelle séquence créée aléatoirement pourrait être générée, jusqu'à la présence d'un codon STOP. La **Figure 32** confirme la création de codons STOP prématurés au niveau de la région ciblée par les ZFN, pour chaque clone *CD274-KO*. De plus, nous avons criblé ces nouvelles séquences protéiques avec le logiciel BLASTp et démontré qu'elles ne présentent aucune homologie avec d'autres protéines; les domaines créés ne sont donc pas fonctionnels. Cette stratégie d'édition du génome a donc permis la génération d'un modèle cellulaire de MDA-MB-231 *CD274-KO*.

CD274 WT

ADN : GTG GAT CCA GTC ACC TCT GAA CAT GAA CTG ACA TGT CAG GCT GAG GGC TAC CCC AAG
 Protéine : V D P V T S E H E L T C Q A E G Y P K

CD274 KO.2

Insertion: 4 Nucléotides

ADN : GTG GAT CCA GTC ACC TCT GAA CAT GAA CTG ACT GAC ATG TCA GGC TGA GGG CTA CCC
 Protéine : V D P V T S E H E L T D M S G STOP

CD274 KO.4

Délétion: 2 Nucléotides

ADN : GTG GAT CCA GTC ACC TCT GAA CAT ACT GAC ATG TCA GGC TGA GGG CTA CCC
 Protéine : V D P V T S E H T D M S G STOP

CD274 KO.30

Délétion: 5 Nucléotides

ADN : GTG GAT CCA GTC ACC TCT GAA CAT GAC ATG TCA GGC TGA GGG CTA CCC
 Protéine : V D P V T S E H D M S G STOP

CD274 KO.32

Délétion: 2 Nucléotides

ADN : GTG GAT CCA GTC ACC TCT GAA CAT GAA GAC ATG TCA GGC TGA GGG CTA CCC
 Protéine : V D P V T S E H E D M S G STOP

CD274 KO.36

Insertion: 4 Nucléotides

ADN : GTG GAT CCA GTC ACC TCT GAA CAT GAA CTG ACT GAC ATG TCA GGC TGA GGG CTA CCC
 Protéine : V D P V T S E H E L T D M S G STOP

Figure 32: Recherche de codons STOP prématurés au sein des séquences nucléotidiques des clones KO-CD274. Les séquences d'ADN altérées après utilisation des ZFN ont été converties en séquences peptidiques grâce au logiciel ExPASy. Des codons STOP prématurés ont été retrouvés au niveau de la région ciblée par les ZFN. La vérification de l'absence de domaine fonctionnel a été réalisée avec le logiciel NCBI BLASTp. La première Valine (V) de chaque séquence présentée correspond à l'acide aminé n°144 de la protéine PD-L1 (isoformes 1 et 3) et n°30 de l'isoforme 2. Il y a donc invalidation de toutes les isoformes protéiques. En bleu, sont représentés les acides aminés modifiés par rapport à la séquence WT, et en rouge les codons STOP.

1.2. Génération des lignées MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 »

Notre objectif étant d'étudier les fonctions intrinsèques de l'isoforme 1 majeure de la protéine PD-L1, nous avons ensuite voulu générer des lignées de MDA-MB-231 *CD274-KO* ré-exprimant ou non cette protéine.

Pour cela, deux clones *CD274-KO* (clones 2 et 36) ont été transfectés avec un plasmide contrôle pReceiver-M10 « vide » ou contenant l'ADN complémentaire de l'isoforme 1 de PD-L1. Après une sélection à la néomycine pendant 15 jours, les cellules ont été clonées. La validation des clones cellulaires exprimant PD-L1 de façon stable a été faite en Western-blot. A partir des 11 clones transfectés issus des clones *CD274-KO* 2 et 36, une sélection de 3

clones de chaque a été réalisée afin de générer un « *bulk* » de cellules, que nous avons nommé « MDA-MB-231-(PD-L1-KO)-PD-L1 » ou lignée « PD-L1 ». De même, les clones cellulaires transfectés de manière stable avec le plasmide contrôle ont été validés par une PCR amplifiant le gène de résistance à la néomycine, cassette de résistance à l'antibiotique présente dans le plasmide pReceiver-M10. Parmi les différents clones cellulaires issus des clones *CD274-KO* 2 et 36 validés, 3 ont été sélectionnés pour la génération du « *bulk* » de cellules « MDA-(PD-L1-KO)-VIDE », aussi nommé lignée « VIDE ». Ces *bulks* « PD-L1 » et « VIDE » de six clones cellulaires, ont été réalisés dans l'objectif de s'affranchir des biais dûs aux différences inter-clonales. Les résultats de Western-blot et PCR ayant servis à la sélection des clones cellulaires sont présentés en **Annexe 4**.

1.3. Validation des lignées MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 »

Afin de valider les lignées MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 », l'expression de l'isoforme 1 de PD-L1 dans ces cellules a été analysée par Western-blot, immunofluorescence et cytométrie en flux. En **Figure 33A**, nous observons la présence d'une bande de 50 kDa correspondant à la protéine PD-L1 uniquement dans le lysat de protéines totales de la lignée « PD-L1 », confirmant son absence d'expression dans la lignée « VIDE ». Toutefois, il est intéressant de noter que la taille théorique de notre protéine d'intérêt est de 33,3 kDa. Nous savons que la partie extra-membranaire de PD-L1 contient trois résidus potentiellement glycosylables (aa35, aa200 et aa219) et un résidu glycosylé (aa192)¹⁸². L'acide-aminé 35 se situe au niveau du domaine IgV de PD-L1, alors que les acides-aminés 192, 200 et 219 sont localisés au niveau du domaine IgC₂. Selon la base de données de séquences de protéines *UniProt*, il s'agirait de N-glycosylation. Afin de vérifier si la différence entre les tailles observée et théorique est due à une potentielle N-glycosylation, nous avons traité les cellules MDA-MB-231 *Wild-type* pendant 24 heures à la tunicamycine, inhibiteur de N-glycosylation, puis analysé la taille de la protéine PD-L1 en Western-blot. De manière intéressante, suite à un traitement avec cet inhibiteur et quelle que soit sa concentration, nous observons l'apparition d'une bande d'environ 33 kDa, taille théorique de l'isoforme 1 de PD-L1, en comparaison à la condition non traitée (**Figure 33B**). Ces résultats confirment donc la présence d'un ou plusieurs résidus N-glycosylables au sein de la séquence protéique de PD-L1.

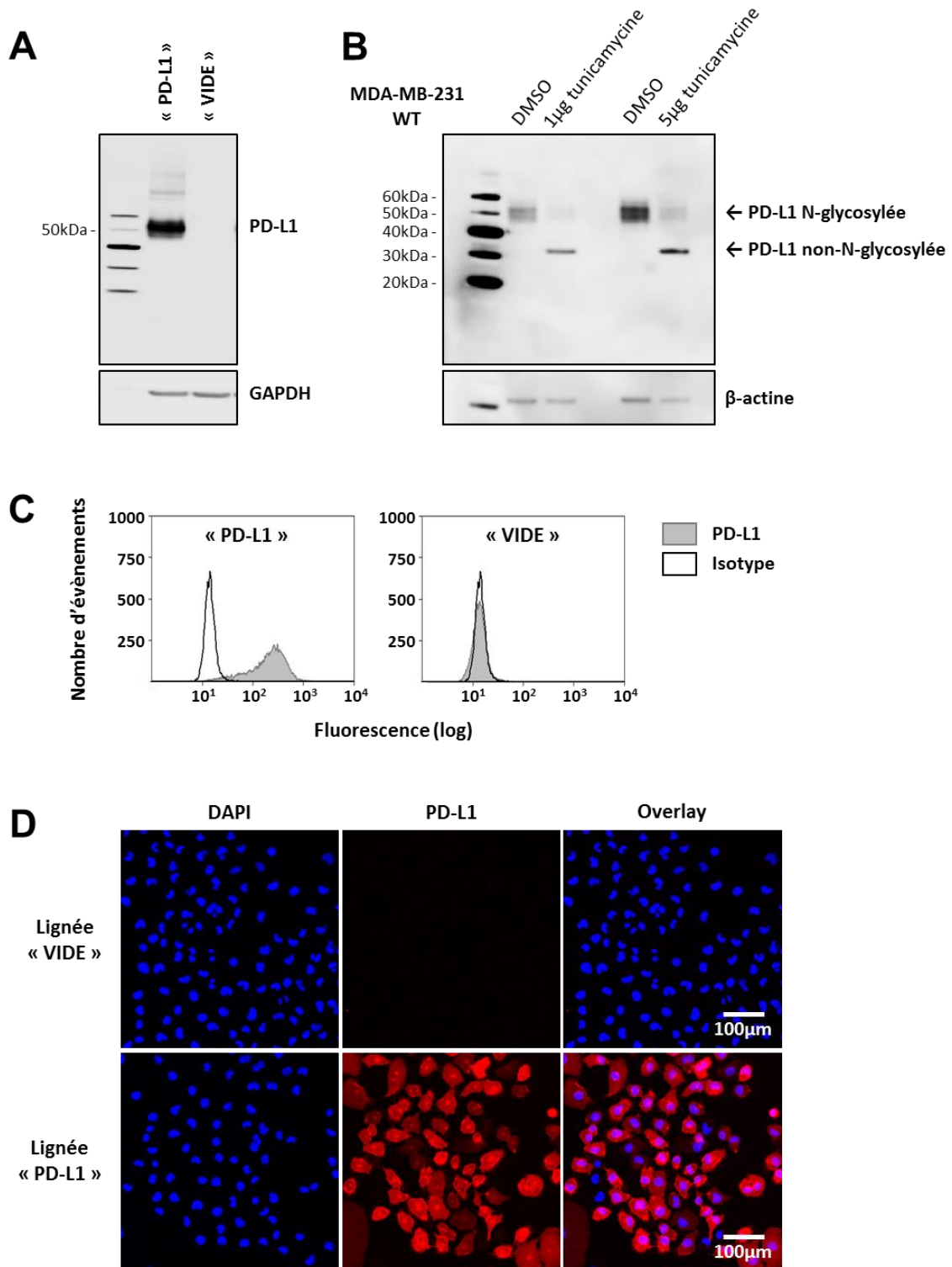


Figure 33: Validation des lignées MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 » par Western-blot, cytométrie en flux et immunofluorescence. **A)** Expression de PD-L1 analysée dans les lignées générées MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 ». La GAPDH a été utilisée comme témoin de charge. **B)** Les cellules MDA-MB-231 Wild-type ont été traitées pendant 24 heures à la tunicamycine, inhibiteur de la N-glycosylation, aux concentrations indiquées, ou avec du DMSO comme contrôle. L'expression de PD-L1 a ensuite été analysée par Western-blot. La β-actine a été utilisée comme témoin de charge. Analyse de l'expression dans les lignées MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 » par cytométrie en flux (**C**) et immunofluorescence (**D**).

La molécule PD-L1 étant décrite comme protéine de surface, cette caractéristique a été analysée en cytométrie en flux et immunofluorescence par microscopie confocale. La **Figure 33C** confirme l'expression de surface de cette protéine dans la lignée « PD-L1 », ainsi que son absence dans la lignée contrôle « VIDE ». Les résultats obtenus par immunofluorescence sont plus surprenants, car outre cette localisation membranaire, nous pouvons observer une localisation intracellulaire cytoplasmique et, plus faiblement, nucléaire (**Figure 33D**). Ces résultats sont toutefois en accord avec la localisation intracellulaire de PD-L1 décrite par Ghebeh *et al.* en 2010 pour cette lignée²³⁶. Ces données laissent donc penser à l'existence de fonctions intrinsèques de PD-L1.

2. Génération de lignées cellulaires surexprimant l'isoforme 1 de PD-L1

Afin de compléter notre étude, nous avons généré d'autres modèles de surexpression de l'isoforme 1 de PD-L1 à partir des lignées cancéreuses humaines K562 (leucémie myéloïde chronique), A375 (mélanome), ainsi que la lignée de cancer du sein MCF7, exprimant faiblement la protéine PD-L1. Pour cela, chaque lignée a été transfectée soit avec le plasmide contrôle pReceiver-M10, soit avec ce même plasmide codant l'isoforme 1 de la protéine PD-L1. 48 heures après transfection, une sélection à la néomycine a été réalisée, suivie d'une validation par Western-blot et microscopie confocale des lignées obtenues. En **Figure 34**, nous observons en Western-blot une surexpression de la protéine PD-L1 dans les lignées transfectées de manière stable A375 et K562. Dans le cas présent, cette expression n'est pas retrouvée pour les lignées A375 et K562 *Wild-type* ou transfectées avec le plasmide contrôle. Cela s'explique car la protéine PD-L1 endogène est très faiblement exprimée par rapport à la forme exogène présente dans ces lignées de surexpression. Les dépôts correspondants aux MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 » sont respectivement, les contrôles négatif et positif de l'expression de cette protéine. Ces Western-blot permettent donc de valider la surexpression de PD-L1 dans les lignées A375, K562 et MCF7, ainsi qu'un différentiel d'expression suffisamment conséquent entre les lignées transfectées « VIDE » et « PD-L1 » pour justifier la comparaison de ces deux lignées lors de prochaines expériences.

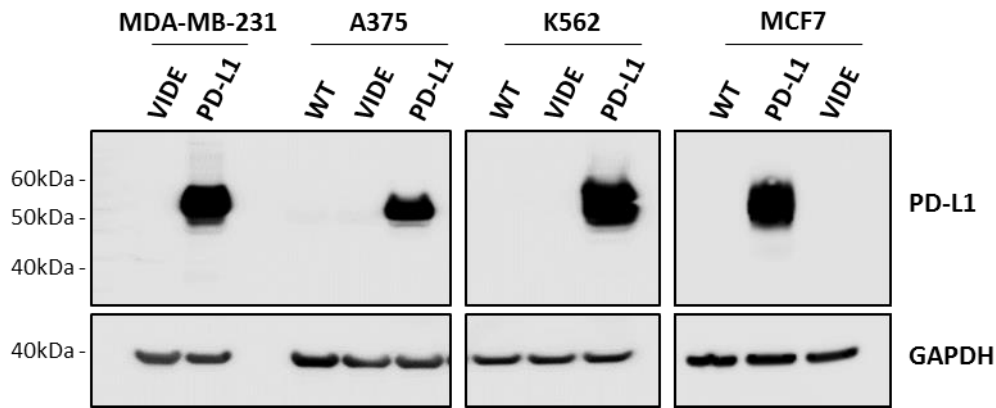
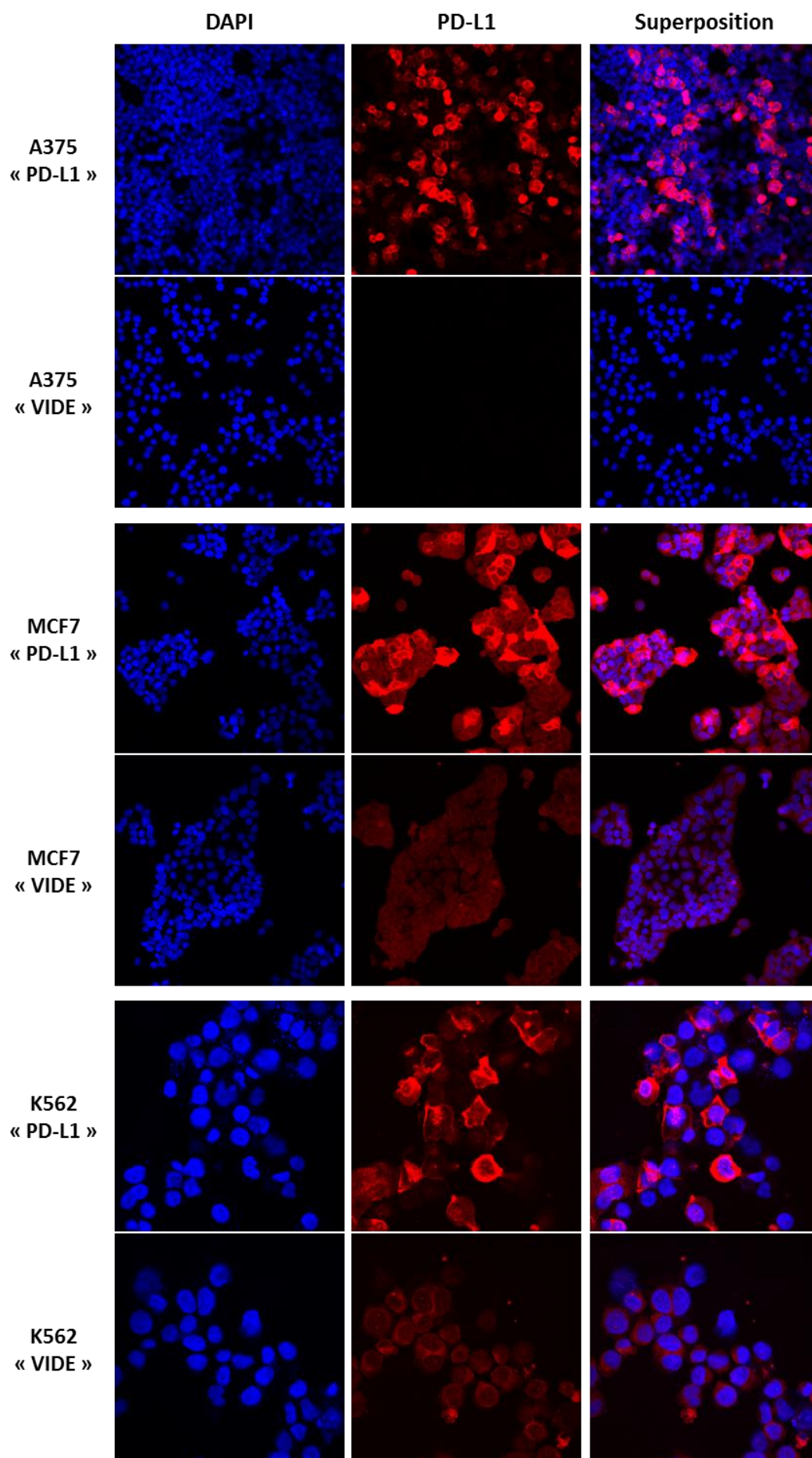


Figure 34: Expression de la protéine PD-L1 dans les lignées stables MDA-MB-231, A375, K562 et MCF7. Cette expression a été évaluée par Western-blot à partir de lysats totaux des cellules MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 » ainsi que des A375, K562 et MCF7 transfectées de façon stable avec des plasmides contrôle ou codant l'isoforme 1 de PD-L1. La GAPDH a été utilisée comme témoin de charge.

Cette surexpression a également été validée par immunofluorescence pour les lignées A375, MCF7 et K562 transfectées « VIDE » ou « PD-L1 » (**Figure 35**). A l'inverse des Western-blot, le marquage de la protéine PD-L1 a permis de détecter un signal dans les lignées MCF7 et K562 « VIDE », démontrant une expression de la protéine endogène, faible mais existante, non détectée en Western-blot. D'autre part, et ce pour les trois lignées testées, nous observons une différence d'intensité de marquage de la protéine PD-L1 entre les cellules « VIDE » et les « PD-L1 », suggérant une expression plus importante de celle-ci. La surexpression de PD-L1 est donc validée dans ces lignées, de même qu'un différentiel d'expression, en faisant de bons modèles pour les futures expériences fonctionnelles. Notons que PD-L1 est retrouvée fortement exprimée dans le cytoplasme et plus faiblement dans le noyau de ces cellules, confirmant les données précédemment obtenues avec les MDA-MB-231 (**Figure 33D**).

Figure 35: Analyse par immunofluorescence de l'expression de PD-L1 dans les lignées stables A375, MCF7 et K562. L'expression de PD-L1 a été vérifiée par immunofluorescence après sélection à la néomycine des trois lignées A375, MCF7 et K562 transfectées de manière stable, soit avec un plasmide vide contrôle pReceiver-M10 ou avec le même plasmide codant l'isoforme 1 de PD-L1. Les images de gauche correspondent au marquage nucléaire avec du DAPI, celles du milieu au marquage de PD-L1, et les images de droite à la superposition des deux fluorescences.



CONCLUSION PARTIE I. Génération des modèles cellulaires d'étude

Avec l'objectif d'étudier les fonctions de l'isoforme 1 de la protéine PD-L1, nous avons généré une lignée de cancer du sein MDA-MB-231 dont le gène *CD274* codant cette protéine a été invalidé par stratégie d'édition du génome. Cette lignée *KO* a ensuite été transfectée de manière stable par un vecteur d'expression de PD-L1 et sélectionnée d'après les données de la littérature démontrant une expression de surface importante de cette protéine ²³⁶. Plus tardivement, nous avons également produit des lignées de cancer du sein MCF7, de mélanome A375 et de leucémie lymphoïde chronique K562 surexprimant cette isoforme.

De manière intéressante, si la protéine PD-L1 avait jusqu'à présent été décrite comme molécule de surface ¹⁷⁰, nos expériences de microscopie par immunofluorescence ont révélé une expression sub-cellulaire importante au niveau du cytoplasme et plus faiblement dans le noyau. Nous pouvons également noter que l'expression de surface est peu retrouvée à la surface des cellules MCF7, A375 et K562 en cytométrie en flux. Cela suggère l'existence de fonctions intrinsèques de la protéine PD-L1 dans ces lignées.

Nous avons donc généré des modèles cellulaires nécessaires à l'étude du rôle de l'expression de la protéine PD-L1. Nous nous sommes tout d'abord intéressés à son impact au niveau phénotypique et transcriptomique. Cette étude a été réalisée à partir du modèle d'étude MDA-MB-231 généré.

PARTIE II. Caractérisation phénotypique et transcriptomique de l'impact de PD-L1 dans les cellules tumorales

1. Evaluation phénotypique du rôle de PD-L1 dans les cellules tumorales

La protéine PD-L1 a été démontrée comme ayant un rôle dans la croissance cellulaire. En effet, l'expression de PD-L1 dans des cellules de cholangiocarcinome et des cellules souches de cancer gastrique favorise leur croissance^{224,225}, alors qu'à l'inverse, elle maintient un phénotype souche dans le cas de cellules cancéreuses de sein²²⁶. Aussi, et dans l'objectif second de caractériser notre modèle de MDA-MB-231, nous nous sommes intéressés au rôle de PD-L1 au niveau de la croissance cellulaire.

1.1. La protéine PD-L1 module la croissance des cellules MDA-MB-231

Premièrement, nous avons voulu évaluer l'effet de l'isoforme 1 de PD-L1 sur la croissance des cellules cancéreuses de sein MDA-MB-231 *in vitro*. Pour cela, et à partir des deux lignées générées « VIDE » et « PD-L1 », nous avons réalisé des tests clonogéniques, et évalué la croissance en cultures 2D et 3D, ainsi que lors d'un test de compétition, celui-ci nous permettant de déterminer si l'une des deux lignées a un avantage de croissance par rapport à la seconde.

En **Figure 36A**, nous pouvons voir les colonies cellulaires formées 10 jours après ensemencement des cellules « VIDE » et « PD-L1 », en condition basale (normoxie) ou hypoxique ; cette dernière afin d'accroître la potentielle différence de croissance pouvant exister entre les deux lignées. La condition hypoxique a été réalisée dans une étuve à hypoxie ou suite à un traitement avec du CoCl_2 , agent induisant la stabilisation du facteur HIF-1 α . S'il n'y a pas de différence observée en normoxie, l'induction d'un état hypoxique favorise la formation de colonies et l'augmentation de leur taille, dans la lignée MDA-MB-231 « VIDE » par rapport à la lignée « PD-L1 ». Ce résultat a été confirmé lors de tests de croissance en culture 3D (**Figure 36B**). Ce type de culture permet aux cellules de croître ou d'interagir avec leur environnement dans les trois dimensions, et est de ce fait plus représentatif de ce qui se produit réellement *in vivo*. Ainsi, que ce soit en condition de normoxie, d'hypoxie ou après traitement au CoCl_2 , les sphéroïdes observés pour la lignée « PD-L1 » sont de taille réduite par rapport à ceux de la lignée « VIDE » (**Figure 36B**). Ces résultats nous ont conduits à réaliser une cinétique de croissance par comptages sur 6 jours. Celle-ci montre une diminution significative de la croissance cellulaire dans la lignée MDA-MB-231 « PD-L1 » comparée à la

lignée « VIDE », respectivement de 18%, 19% et 27% aux jours 3, 4 et 6 (**Figure 36C**). Cette différence a été confirmée suite à un test de compétition entre les deux lignées. Pour cela, les cellules « VIDE » et « PD-L1 » ont été ensemencées à un ratio de 1/1 qui a ensuite été évalué par cytométrie en flux pendant 14 jours afin de déterminer un potentiel avantage au profit d'une des deux lignées. Ainsi, après 3 jours de culture, les cellules « PD-L1 » représentent 39% de la population totale, contre 61% pour les « VIDE ». Cette proportion se révèle relativement stable dans la durée, puisque après 14 jours de culture, 42% des cellules sont de la lignée « PD-L1 » et 58% des « VIDE » (**Figure 36D**). Pour résumer, la protéine PD-L1 confère un désavantage de croissance *in vitro* dans notre modèle cellulaire MDA-MB-231.

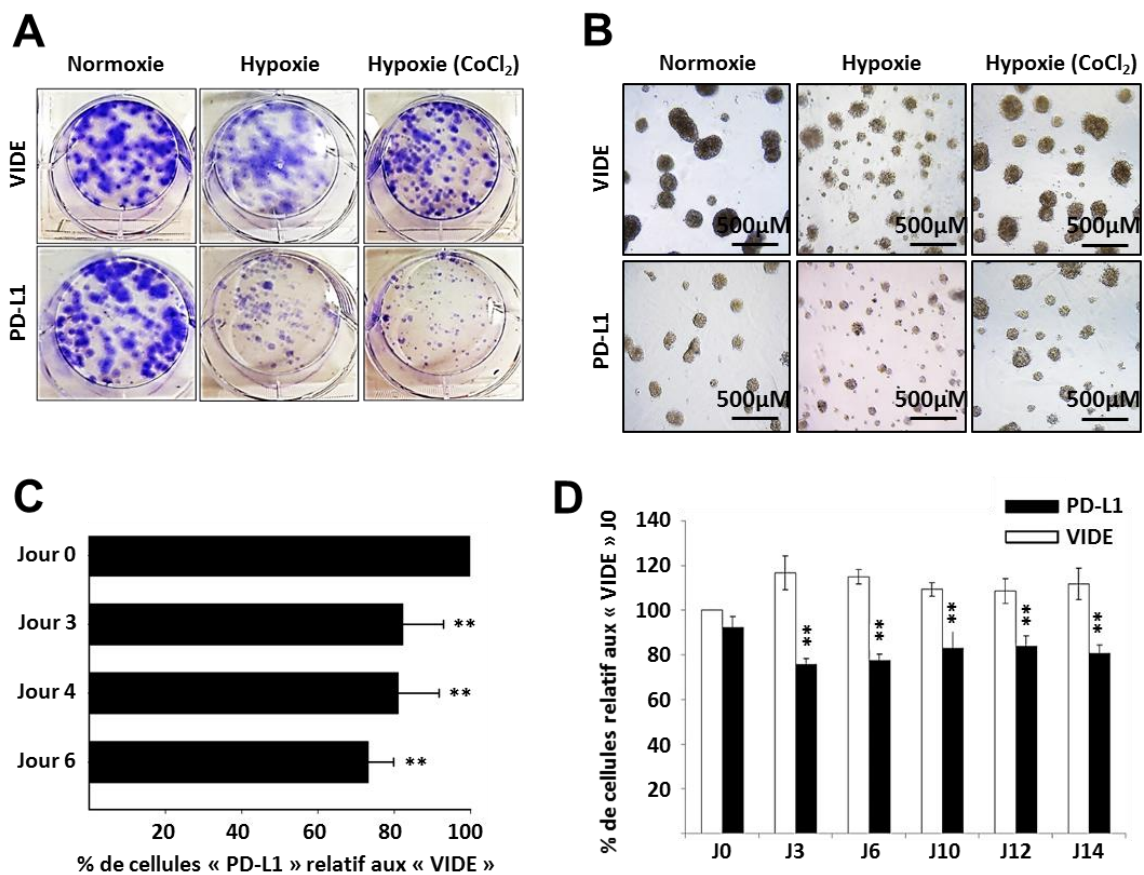


Figure 36 : L'expression de PD-L1 module la croissance des cellules MDA-MB-231. A) Test clonogénique des cellules MDA-MB-231 ± PD-L1, ensemencées à 200 cellules / puits en plaque 6 puits, puis cultivées en condition basale (normoxie), en étuve à hypoxie ou avec 200 μ M de CoCl₂, agent mimant les conditions hypoxiques. Après 10 jours, les cellules sont fixées au PAF et marquées au crystal violet. L'expérience présentée est représentative d'au minimum 3 réalisées. **B)** Ces cellules sont cultivées en 3D (**Matériel et Méthodes, chapitre 4.1.3.**) et dans les mêmes conditions qu'en A) pendant 10 jours. Les images de microscopie présentées sont représentatives des deux expériences. **C)** Cinétique de croissance des cellules MDA-MB-231 ± PD-L1, ensemencées au jour 0 à raison de 50 000 cellules par boîte de pétri 100 mm et comptées après 3, 4 et 6 jours. Les barres représentent le pourcentage relatif de cellules « PD-L1 » / « VIDE » à un temps donné ± l'écart-type ($n = 6$; test de Student ; ** $p < 0,01$). **D)** Test de compétition entre les cellules « VIDE » et « PD-L1 ». Après avoir été ensemencées à un ratio 1/1, l'évolution de celui-ci a été analysée en cytométrie en flux après marquage des cellules par un anticorps anti-PD-L1 ou son isotype contrôle ($n = 3$; test de Student ; ** $p < 0,01$).

La croissance est le résultat d'une balance entre capacités prolifératives et mort cellulaire. Nous avons donc étudié l'influence de la protéine PD-L1 sur la mort cellulaire et les propriétés prolifératives de nos modèles cellulaires MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 ». Ainsi, l'expression de l'isoforme 1 de PD-L1 provoque une diminution de 6%, faible mais significative, de la survie des cellules MDA-MB-231 par rapport aux cellules « VIDE » après 24 heures de culture (**Figure 37A**). PD-L1 accroît donc le taux d'apoptose basal de cette lignée. Les propriétés prolifératives de ces cellules ont ensuite été évaluées en analysant le cycle cellulaire par incorporation d'Iodure de Propidium. Nous n'observons aucune différence entre les pourcentages de cellules « VIDE » et « PD-L1 » en phases G1 (environ 50%), S (environ 15%) et G2/M (environ 35%) (**Figure 37B**). Une expérience similaire réalisée sur les cellules cultivées en condition mimant un état hypoxique avec du CoCl_2 n'a pas permis de déceler une éventuelle différence de cycle cellulaire entre ces deux lignées MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 » (données non montrées).

La différence de croissance observée *in vitro* serait donc due à une augmentation du taux basal de mortalité pour les cellules exprimant PD-L1, sans impact au niveau des capacités prolifératives de ces cellules par rapport aux contrôles « VIDE ».

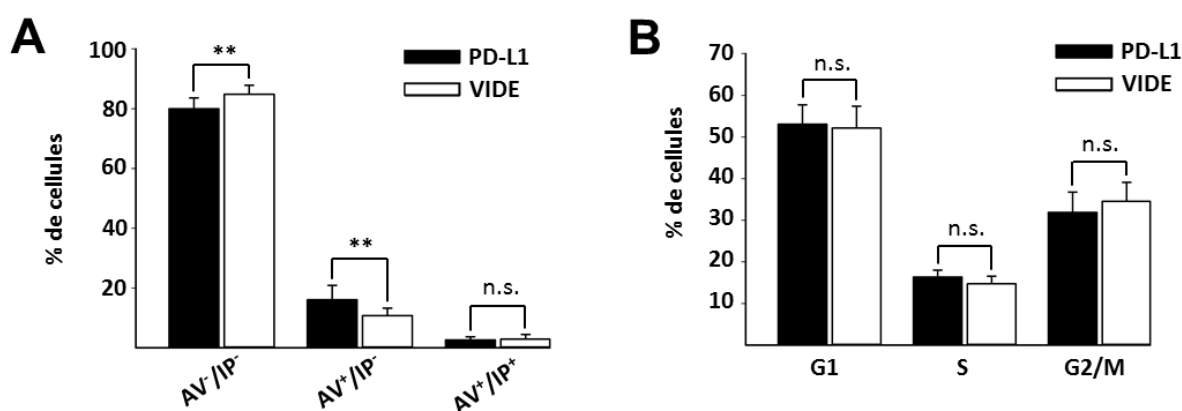


Figure 37 : Survie et prolifération des cellules MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 » *in vitro*. **A)** Le taux basal de mortalité des lignées « VIDE » et « PD-L1 » a été analysé par un test Annexine V/PI. Les cellules non marquées AV/IP⁻ sont considérées vivantes, AV⁺/IP⁻ en apoptose précoce et les AV⁺/IP⁺ en apoptose tardive ($n = 5 \pm$ l'écart-type ; test de Student, $**p < 0,01$). **B)** Le cycle cellulaire des cellules MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 » a été analysé en cytométrie en flux après incorporation d'Iodure de Propidium ($n = 3 \pm$ l'écart-type). n.s., non significatif.

1.2. PD-L1 favorise la progression tumorale *in vivo*

Les résultats précédents démontrent une diminution de la croissance cellulaire induite *in vitro* par l'expression de l'isoforme 1 de PD-L1. Nous avons donc poursuivi en étudiant, deuxièmement, l'impact que peut avoir cette protéine sur la croissance tumorale *in vivo*. Pour

cela, nous avons réalisé des xénogreffes de cellules MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 » dans un modèle murin immuno-déficient *Nude*, en injectant les cellules en sous-cutané. En **Figure 38A**, les souris injectées avec les cellules « PD-L1 » présentent, 80 jours après injection, une élévation significative de 46% de la croissance tumorale par rapport aux tumeurs issues des cellules « VIDE ». Il est intéressant de noter que l'augmentation de la taille des tumeurs due à l'expression de PD-L1 semble résulter d'une prise de greffe plus rapide de ces cellules par rapport aux « VIDE ». Ces résultats démontrent par ailleurs la capacité de cette protéine à engendrer une agressivité tumorale accrue malgré l'absence de lymphocytes T, cellules dans lesquelles son récepteur PD-1 est fortement exprimé. L'augmentation de la croissance tumorale par « PD-L1 » a également été observée dans deux autres expériences indépendantes (**Figure 38B**).

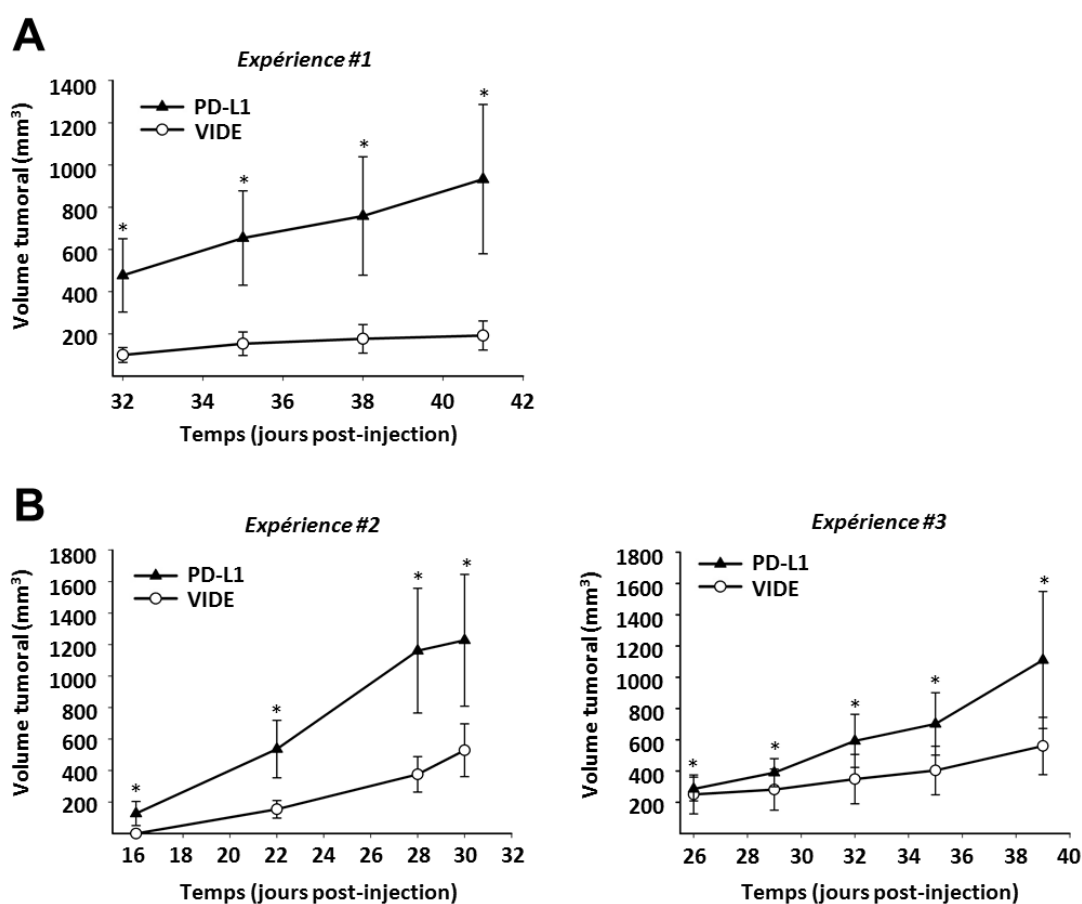


Figure 38 : L'expression de PD-L1 favorise la croissance tumorale in vivo. A) 10^6 cellules MDA-MB-231 «VIDE» ou «PD-L1» ont été injectées en sous-cutané au niveau du flanc droit de souris femelles athymiques *Nude* de 8 semaines ($n = 8$ souris / groupe). Le volume tumoral a ensuite été mesuré avec un caliper pendant 6 semaines (moyenne \pm SEM). La moyenne des volumes tumoraux produits par les cellules « PD-L1 » est significativement plus élevée que pour les cellules « VIDE » (* $p < 0,05$). **B)** Deux autres expériences identiques à celle décrite en **A)**.

Pour aller plus loin, nous avons voulu déterminer les voies de signalisation modulées par l'expression de PD-L1. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'étude du kinome ou « *phosphorylation antibody-array* », réalisée par la société Full Moon BioSystems (Sunnyvale, CA), ainsi qu'au transcriptome par puce Affymetrix et dont l'analyse a été effectuée par la plateforme de Génomique de Lille 2.

2. Impact de PD-L1 sur le kinome des cellules MDA-MB-231

2.1. Analyse globale du kinome

Une étude « *phosphorylation antibody-array* » consiste en un test ELISA à haut débit, conçu pour le profilage de la phosphorylation des protéines à large spectre, impliquées dans diverses voies de signalisation et processus biologiques. Ce test comprend 1318 anticorps spécifiques d'une protéine ou d'un type de phosphorylation au niveau d'un site particulier. De cette manière, nous avons analysé le kinome de nos lignées générées MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 » en condition basale de culture. Après analyse des données obtenues, nous avons retenu les sites de phosphorylation pour lesquels le ratio lignée « PD-L1 » / lignée « VIDE » était inférieur à 0,7 ou supérieur à 1,3. Etonnement, sur les 1318 sites analysés, seuls 23 valident ce critère : 14 protéines présentent une élévation de la phosphorylation sur un de leur site ; les 9 protéines restantes montrant une diminution (**Figure 39**).

Protéine	Site de phosphorylation		Ratio "PD-L1" / "VIDE"	
Merlin	pSer10	↑	2,23	
Caspase 9	pTyr153	↑	2,19	
HDAC1	pSer421	↑	1,76	
HSL	pSer554	↑	1,46	
FER	pTyr402	↑	1,46	
CaMK1-α	pThr177	↑	1,45	
Pyk2	pTyr580	↑	1,41	
Keratin 18	pSer33	↑	1,40	
LKB1	pThr189	↑	1,39	
eEF2K	pSer366	↑	1,36	
CDC25A	pSer75	↑	1,34	
Zap-70	pTyr493	↑	1,34	
EGFR	pTyr1110	↑	1,32	
Caspase 9	pSer196	↑	1,32	
CDK5	pTyr15	↓	0,58	
CaMK2A	pThr286	↓	0,58	
MEF2A	pSer408	↓	0,65	
PDK1	pSer241	↓	0,66	
SYK	pTyr525	↓	0,67	
P73	pTyr99	↓	0,67	
IL-10R-α	pTyr496	↓	0,68	
p53	pSer6	↓	0,68	
CD5	pTyr453	↓	0,69	

Figure 39 : Modulation du kinome par la protéine PD-L1. Analyse réalisée par la société Full Moon BioSystems ; Sont présentés ici les 23 sites de phosphorylation possédant un ratio « PD-L1 » / « VIDE » < 0,7 (représenté par des flèches rouges) ou > 1,3 (flèches vertes).

Parmi ces sites de phosphorylation, nous nous sommes particulièrement intéressés à celui de la protéine p53, celle-ci étant connue pour avoir un rôle clé dans la régulation du cycle cellulaire et de la mort par apoptose lors du développement tumoral ³¹⁹.

2.2. Validation de la modulation de la phosphorylation de la Sérine 6 de p53

D'après les données du kinome, le ratio « PD-L1 » / « VIDE » du taux de phosphorylation de la sérine 6 de p53 est de 0,68. Cette différence a été validée par Western-blot. En effet, **Figure 40A**, nous pouvons observer une phosphorylation plus importante au niveau de p53-Ser6 dans la lignée « VIDE » comparée à « PD-L1 », que ce soit en conditions de culture basale (milieu complet, 10% SVF) ou après induction d'un stress (milieu complet, 0,1% SVF). En outre, une condition de déficit en SVF ne semble pas affecter le différentiel de phosphorylation. D'autre part, nous n'observons pas de différence d'expression globale de la protéine p53 entre les deux lignées (**Figure 40A**).

La protéine p53 possédant plusieurs résidus phosphorylables, nous avons vérifié à partir des données du kinome que seule la sérine 6 est impactée par l'expression de PD-L1. Les 10 autres résidus de p53 analysés lors de l'étude du kinome (Ser9, Ser15, Thr18, Ser20, Ser33, Ser37, Ser46, Ser315, Ser378 et Ser392) ne semblent pas présenter un différentiel de phosphorylation entre les deux lignées, leurs ratios « PD-L1 » / « VIDE » étant compris entre 0,83 et 1,14 (**Figure 40B**).

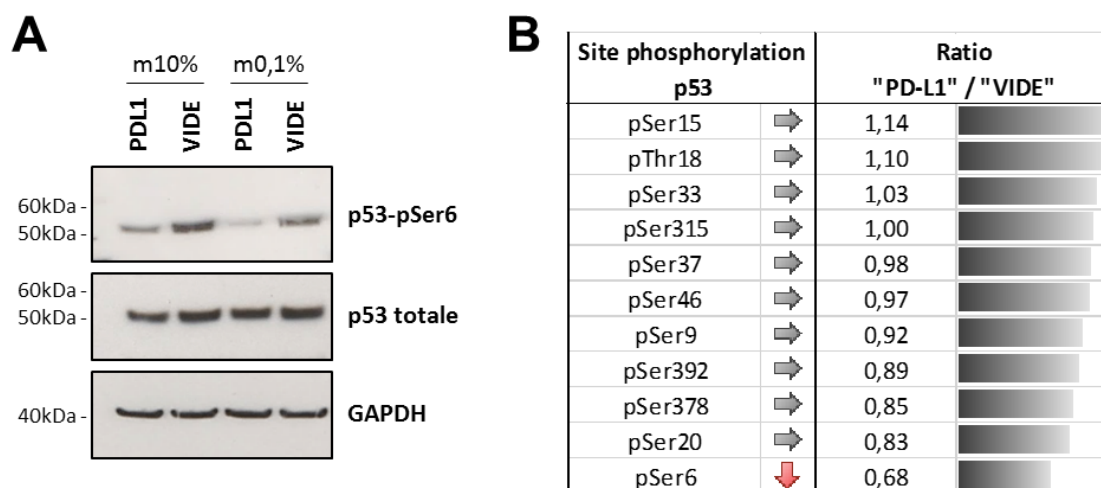


Figure 40: Validation du différentiel de phosphorylation de p53-Ser6. **A)** Evaluation par Western-blot de l'expression de la protéine p53 phosphorylée au niveau de la sérine 6 ainsi que de la protéine p53 totale à partir de lysats totaux de cellules MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 » cultivées pendant 24 heures avec du milieu complet 10% SVF (m10%) ou en condition de privation avec 0,1% de SVF (m0,1%). La GAPDH a été utilisée comme témoin de charge. **B)** Les ratios « PD-L1 » / « VIDE » au niveau de divers résidus phosphorylables de la protéine p53, obtenus suite à l'analyse du kinome.

Le résidu sérine 6 de p53 est décrit comme phosphorylé suite à un stress responsable de dommages à l'ADN⁵⁶¹. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) étant connues pour provoquer de tels dommages, nous nous sommes demandés si un traitement des cellules MDA-MB-231 « PD-L1 » et « VIDE » avec l'agent pro-oxydant tH₂O₂ pourrait activer p53, de manière à moduler la différence de phosphorylation observée en condition basale au niveau de la Ser6 entre les deux lignées. En **Figure 41A**, si la phosphorylation de p53-Ser6 est accentuée pour les deux lignées « PD-L1 » et « VIDE » lors d'un traitement au tH₂O₂, la différence de taux continue de subsister. Nous avons également voulu évaluer cette phosphorylation après traitement avec un agent anti-oxydant, la NAC (N-acétylcystéine), afin de déterminer si la diminution de production de ROS subséquente abolirait le différentiel de phosphorylation p53-Ser6 entre les deux lignées. L'analyse par Western-blot ne semble pas aller dans ce sens (**Figure 41B**). Toutefois, après un traitement à la NAC, la morphologie des cellules observée au microscope est modifiée, signifiant l'induction d'un stress cellulaire par cet agent (données non montrées). Il est donc difficile de conclure à partir d'un tel résultat.

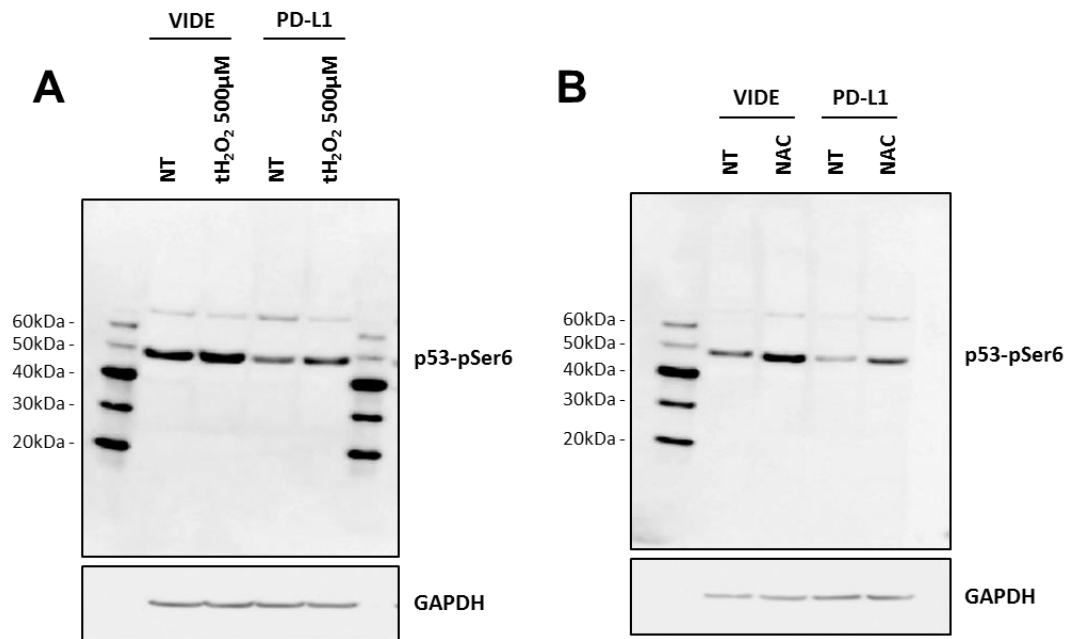


Figure 41: Evaluation de la phosphorylation p53-Ser6 après traitement au tH₂O₂ ou à la NAC. L'expression de p53-Ser6 a été évaluée par Western-blot à partir de lysats totaux de cellules MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 », traitées avec 500 μM de tH₂O₂ (A) ou 1 mM de NAC (B) pendant respectivement 16 ou 24 heures. La GAPDH a été utilisée comme témoin de charge.

Dans un second temps, nous avons voulu vérifier la diminution de phosphorylation du résidu sérine 6 de p53 dans les autres modèles cellulaires de surexpression de l'isoforme 1 de PD-L1, MCF7, A375 et K562 (**Figure 42**). Les deux lignées MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 » utilisées en tant que contrôle valident une nouvelle fois cette réduction du taux de phosphorylation de Ser6 suite à l'expression de PD-L1. En revanche, aucune expression de p53-Ser6 n'est observée dans les autres lignées cellulaires « VIDE » et « PD-L1 » générées, suggérant une absence de phosphorylation de la protéine p53 au niveau de la sérine 6 en condition basale de culture. Le statut du gène *TP53* pourrait également expliquer cette absence de détection de la protéine par Western-blot. En effet, contrairement aux cellules MDA-MB-231 qui expriment une forme mutée active de p53⁵⁶², les lignées MCF7 et A375 expriment la forme sauvage de cette protéine, dont les niveaux de stabilisation sont plus faibles⁵⁶². Les cellules K562 étant *TP53*^{-/-562}, il est donc normal qu'aucune expression de p53 soit retrouvée.

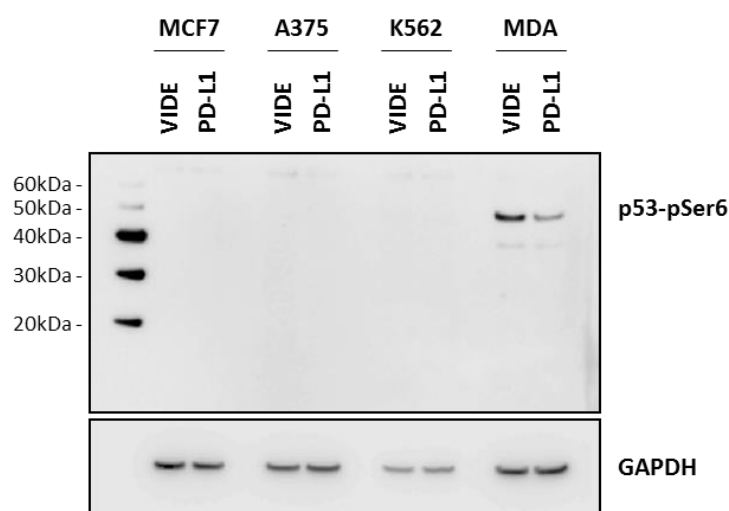


Figure 42: Evaluation de la phosphorylation p53-Ser6 dans les différents modèles cellulaires générés. L'expression de p53-Ser6 a été évaluée par Western-blot à partir de lysats totaux des modèles cellulaires MCF7, A375, K562 et MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 », en condition basale de culture. La GAPDH a été utilisée comme témoin de charge.

2.3. Evaluation de l'expression de gènes cibles de p53

L'existence d'une différence de phosphorylation au niveau du résidu p53-Ser6 laissant penser à une activation modifiée de cette protéine, nous nous sommes intéressés à l'expression de gènes cibles de p53. Pour cela, nous avons dans un premier temps réalisé une *PCR array* criblant la voie de signalisation p53 en testant l'expression de 84 de ses gènes cibles (données non montrées). Les modulations d'expression des gènes entre les lignées MDA-MB-231 « PD-L1 » et « VIDE » observées lors de cette expérience ont ensuite été validées en Q-RT-PCR (**Figure 43**). Ainsi, parmi les gènes p53-dépendants influencés par l'expression de PD-L1, les 2/3 présentent une expression diminuée dans la lignée MDA-MB-231 « PD-L1 » par rapport aux cellules « VIDE », suggérant une réduction de l'activité de p53. Nous retrouvons par exemple les gènes *PUMA*, *E2F3*, *XRCC5*, *PCNA*, *MLH1* et *CHK1* dont les expressions sont diminuées respectivement de 33%, 28%, 21%, 30%, 31% et 21%. A l'inverse, une augmentation de 45%, 137% et 56% est à noter pour les gènes *IL6*, *ABCG2* et *P21*. Les modulations des gènes *FOXO3*, *PRKCA* et *RPRM* observées lors de la *PCR array* n'ont pas été mises en évidence lors de ces expériences (**Figure 43**).

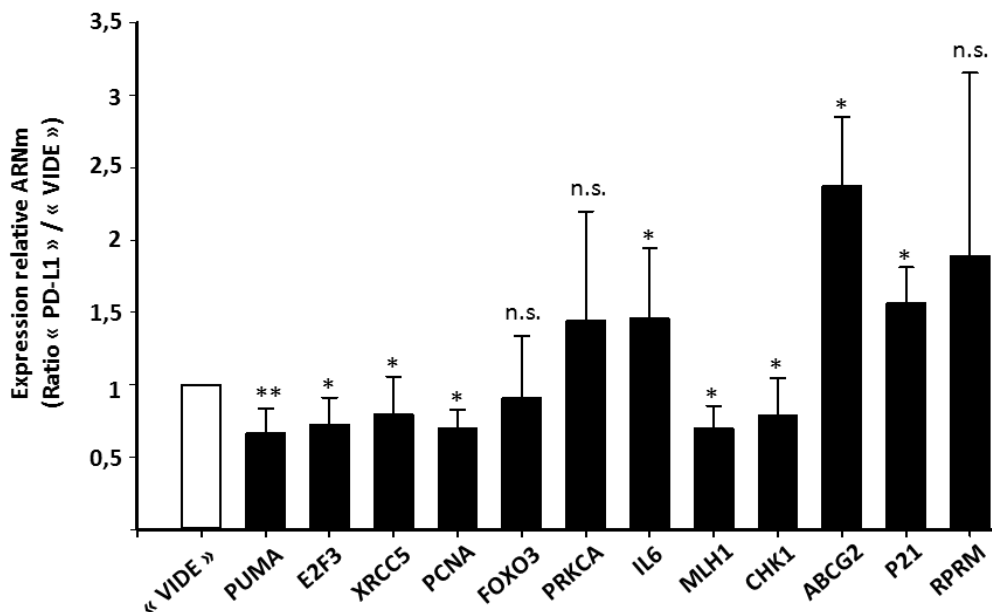


Figure 43: Expression de gènes cibles de p53 évaluée en Q-RT-PCR. Les niveaux d'ARNm des gènes *PUMA*, *E2F3*, *XRCC5*, *PCNA*, *FOXO3*, *PRKCA*, *IL6*, *MLH1*, *CHK1*, *ABCG2*, *P21* et *RPRM* ont été évalués en Q-RT-PCR dans les lignées MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 », en condition basale de culture. Les barres représentent l'expression relative des ARNm dans les cellules MDA-MB-231 « PD-L1 » (barres noires) par rapport aux « VIDE » (représentées par la barre blanche). Les niveaux d'ARNm ont été normalisés avec la *GAPDH* (gène de référence) ($n = 3$ minimum, en triplicat; moyenne \pm l'écart-type; Mann-Whitney Rank Sum test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; n.s, non significatif).

Fonctions principales des gènes réprimés par PD-L1:

- **PUMA** (*p53 upregulated modulator of apoptosis*): Protéine pro-apoptotique, membre de la famille Bcl-2 ⁵⁶³.
- **E2F3** (*E2F transcription factor 3*): Suppresseur de tumeur, rôle dans le contrôle du cycle cellulaire en se liant à la protéine Rb (Protéine du rétinoblastome) ⁵⁶⁴.
- **XRCC5** (*X-ray repair cross complementing 5*): Rôle dans la réparation de l'ADN (processus NHEJ, *non-homologous end joining*) ainsi que dans la maintenance des télomères ⁵⁶⁵.
- **PCNA** (*Proliferating cell nuclear antigen*): Rôle dans la réplication et la réparation de l'ADN, le remodelage de la chromatine et des processus épigénétiques ⁵⁶⁶.
- **MLH1** (*MutL homolog 1*): Rôle dans la réparation de l'ADN (réparation des mésappariements) ⁵⁶⁷.
- **CHK1** (*Checkpoint kinase 1*): Rôle dans la réparation des dommages à l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire et l'induction de la mort lors de dommages trop importants ⁵⁶⁸.

Fonctions principales des gènes induits par PD-L1 :

- **IL6** (*Interleukin 6*): Rôle dans la différenciation des lymphocytes et des monocytes ⁵⁶⁹.

- **ABCG2** (*ATP-binding cassette sub-family G member 2*): Transport de molécules (par exemple, les xénobiotiques) à travers les membranes intra- et extracellulaires ⁵⁷⁰.
- **P21** : Rôle dans la régulation du cycle cellulaire et la réparation de dommages à l'ADN. Peut interagir avec PCNA pour inhiber son rôle dans la réplication de l'ADN. Fonctions anti-apoptotiques ⁵⁷¹.

3. PD-L1 module le transcriptome des cellules MDA-MB-231

3.1. Analyse globale avec le logiciel IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*)

Pour compléter l'analyse du kinome et toujours dans l'objectif de déterminer les voies de signalisation modulées par PD-L1, nous avons effectué une étude du transcriptome avec la plateforme de Génomique de l'Université Lille 2. La comparaison des profils transcriptomiques des lignées MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 » après culture en condition basale a été réalisée suite à leur analyse avec le logiciel *Ingenuity Pathway Analysis*. Le **Tableau 12** correspond aux 20 premières voies de signalisation dérégulées par l'expression de PD-L1 et classées selon leur p-value. La liste complète des gènes dérégulés et dont le ratio d'expression entre les deux lignées est supérieur ou égal à $|1,8|$ est présentée en **Annexe 5**.

<i>Ingenuity Canonical Pathways</i>	-log(p-value)	Gènes
<i>NRF2-mediated Oxidative Stress Response</i>	2,76	<i>GSTM3, NQO2, ABCC2, MRAS, HSPB8, PRKCH, DNAJB2, ACTG2</i>
<i>Axonal Guidance Signaling</i>	2,54	<i>EPHB4, ADAMTS9, ADAM8, FZD8, ADAMTS6, GLI3, GLIS1, EFNB1, MRAS, PRKCH, SEMA7A, ADAMTS4, NRP1</i>
<i>Factors Promoting Cardiogenesis in Vertebrates</i>	2,26	<i>FZD8, SMAD9, TGFBR3, PRKCH, LRP1</i>
<i>Xenobiotic Metabolism Signaling</i>	2,18	<i>GSTM3, NQO2, ABCC2, MRAS, PRKCH, ABCC3, CYP1B1, SULT1A2, MAOA</i>
<i>Superpathway of Melatonin Degradation</i>	2,15	<i>LARGE, CYP1B1, SULT1A2, MAOA</i>
<i>Thyroid Hormone Metabolism II (via Conjugation and/or Degradation)</i>	2,05	<i>LARGE, DIO2, SULT1A2</i>
<i>GABA Receptor Signaling</i>	2,03	<i>KCNN3, KCNN4, MRAS, KCNQ3</i>
<i>Leukocyte Extravasation Signaling</i>	1,95	<i>MMP23B, ARHGAP9, PECAM1, VAV1, PRKCH, ACTG2, MSN</i>
<i>Ephrin B Signaling</i>	1,91	<i>EPHB4, EFNB1, MRAS, VAV1</i>
<i>Mechanisms of Viral Exit from Host Cells</i>	1,86	<i>CHMP4C, PRKCH, ACTG2</i>
<i>VEGF Family Ligand-Receptor Interactions</i>	1,85	<i>PLA2G4A, MRAS, PRKCH, NRP1</i>
<i>LXR/RXR Activation</i>	1,77	<i>SAA1, ACACA, SAA2, TLR3, TNFRSF11B</i>
<i>ErbB Signaling</i>	1,67	<i>NRG2, MRAS, PRKCH, AREG</i>
<i>Cellular Effects of Sildenafil</i>	1,67	<i>KCNN3, KCNN4, KCNQ3, ACTG2, CACNA1A</i>
<i>Neuregulin Signaling</i>	1,64	<i>NRG2, MRAS, PRKCH, AREG</i>

<i>Mouse Embryonic Stem Cell Pluripotency</i>	1,53	<i>FZD8, ID2, SMAD9, MRAS</i>
<i>Differential Regulation of Cytokine Production in Intestinal Epithelial Cells by IL-17A and IL-17F</i>	1,49	<i>DEFB103A/DEFB103B, CCL3</i>
<i>Melatonin Degradation I</i>	1,48	<i>LARGE, CYP1B1, SULT1A2</i>
<i>CDK5 Signaling</i>	1,47	<i>PPP1R14C, CABLES1, MRAS, CACNA1A</i>
<i>Neuropathic Pain Signaling In Dorsal Horn Neurons</i>	1,46	<i>KCNN3, KCNN4, KCNQ3, PRKCH</i>

Tableau 12: Top 20 des voies de signalisation affectées par l'expression de PD-L1. Ces voies de signalisation ont été identifiées par analyse avec le logiciel IPA et organisées selon leur valeur $-\log(p\text{-value})$.

D'après le logiciel d'analyse IPA, la voie de réponse au stress oxydatif NRF2 est la plus significativement modulée. En effet, les expressions de huit gènes de cette voie sont dérégulées suite à l'expression de PD-L1. Parmi ces huit gènes, cinq sont surexprimés dans les cellules « PD-L1 » par rapport aux « VIDE » : *MRAS*, *HSPB8*, *PRKCH*, *DNAJB2* et *ACTG2* (ratios de 1,65, 1,99, 1,74, 1,59 et 1,88, respectivement). A l'inverse, les trois autres (*GSTM3*, *NQO2* et *ABCC2*) sont sous-exprimés, avec des ratios respectifs de -1,52, -1,61 et -1,85 entre la lignée « PD-L1 » et la lignée « VIDE » (**Annexe 5**). Il est intéressant de noter que ces derniers sont des gènes cibles directs du facteur de transcription NRF2, suggérant une diminution de l'activité de ce facteur. D'autre part, 3 voies de signalisation parmi les 20 ici présentes sont connues pour être régulées par la protéine p53, comme la voie de réponse au stress oxydant NRF2, celle du métabolisme des xénobiotiques ainsi que la signalisation CDK5. Ces données pourraient ainsi être liées à celles obtenues lors de l'analyse du kinome.

Fonctions principales des gènes de la voie NRF2 induits par PD-L1:

- ***MRAS*** (*Muscle RAS Oncogene Homolog*): Impliqué dans divers processus biologiques dont la croissance tumorale en impactant des voies impliquées notamment dans la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire.
- ***HSPB8*** (*Heat shock protein beta-8*): Régulation de la prolifération, l'apoptose et la migration cellulaire. Fonctionne également comme protéine chaperonne en association avec *BAG3* (*BCL2-associated athanogene*), stimulateur du processus de macro-autophagie ; action dans le processus de dégradation par le protéasome^{572,573}.
- ***PRKCH*** (*Protein Kinase C Eta*): Impliqué dans divers processus dont la différenciation, la prolifération et l'apoptose cellulaires.
- ***DNAJB2*** (*DnaJ Homolog Subfamily B Member 2*): La protéine codée agit comme une co-chaperonne et contribue au phénomène de dégradation protéasomale des protéines mal conformées⁵⁷⁴.
- ***ACTG2*** (*Gamma-2-Actin*): Rôle dans la motilité cellulaire.

Fonctions principales des gènes de la voie NRF2 réprimés par PD-L1:

- **NQO2** (*NADPH-quinone oxydoréductase 2*): Enzyme de détoxification de phase II. Activité oxydo-réductase et NADPH déshydrogénase.
- **GSTM3** (*Glutathione S-Transferase Mu 3*): Détoxification de composés électrophiles, cancérigènes, composés thérapeutiques, toxines environnementales et produits du stress oxydatif, *via* sa conjugaison avec la glutathione.
- **ABCC2** (*ATP Binding Cassette Subfamily C Member 2*): Transport de molécules à travers les membranes; impliqué dans la résistance à diverses thérapies.

3.2. Dérégulation de la voie anti-oxydante NRF2 suite à l'expression de PD-L1

La modulation de l'expression des effecteurs de NRF2 *NQO2*, *GSTM3* et *ABCC2* a ensuite été confirmée par Q-RT-PCR, avec une diminution de l'expression de ces gènes en condition basale de respectivement 18%, 41% et 33%, dans la lignée MDA-MB-231 « PD-L1 » par rapport à la lignée « VIDE » (**Figure 44A**). La signalisation du facteur NRF2 correspondant à une voie de réponse et de protection envers un stress oxydatif, l'analyse de l'expression de ces mêmes gènes a été réalisée suite à un traitement à la ménadione, molécule pro-oxydante, afin de déterminer si cela amplifierait les différences observées. Un traitement à la ménadione accentue en effet la réduction de l'expression des gènes *NQO2*, *GSTM3* et *ABCC2* entre les cellules « PD-L1 » et « VIDE », avec des valeurs respectives de 37%, 55% et 53% (**Figure 44A**). Nous avons également évalué l'expression d'autres gènes cibles de NRF2 tels que *PRX3* et *SOD1*. Une diminution significative de 48% et 38% de l'expression de ces gènes dans la lignée MDA-MB-231 « PD-L1 » comparée à la lignée « VIDE » est observée après un traitement de 3 heures à la ménadione. Toutefois, aucune différence basale n'est mesurée entre les deux lignées (**Figure 44B**). Ainsi, ces données indiquent une diminution de l'expression d'effecteurs de la voie anti-oxydante NRF2, suggérant une réduction de l'activité de ce facteur de transcription dans la lignée MDA-MB-231 surexprimant PD-L1.

Nous avons ensuite voulu valider ces résultats au niveau protéique en analysant l'expression des effecteurs *GSTM3* et *PRX3* (**Figure 44C**) ainsi que *NQO2* et *SOD1* (**Figure 44D**) par Western-blot. Cette expérience ayant été réalisée plus tardivement lors de l'étude, nous avons pu comparer le rôle de PD-L1 pour chacun des modèles cellulaires de surexpression de l'isoforme 1 de PD-L1 générés, c'est-à-dire également dans les lignées MCF7, A375 et K562, en plus des lignées MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 ».

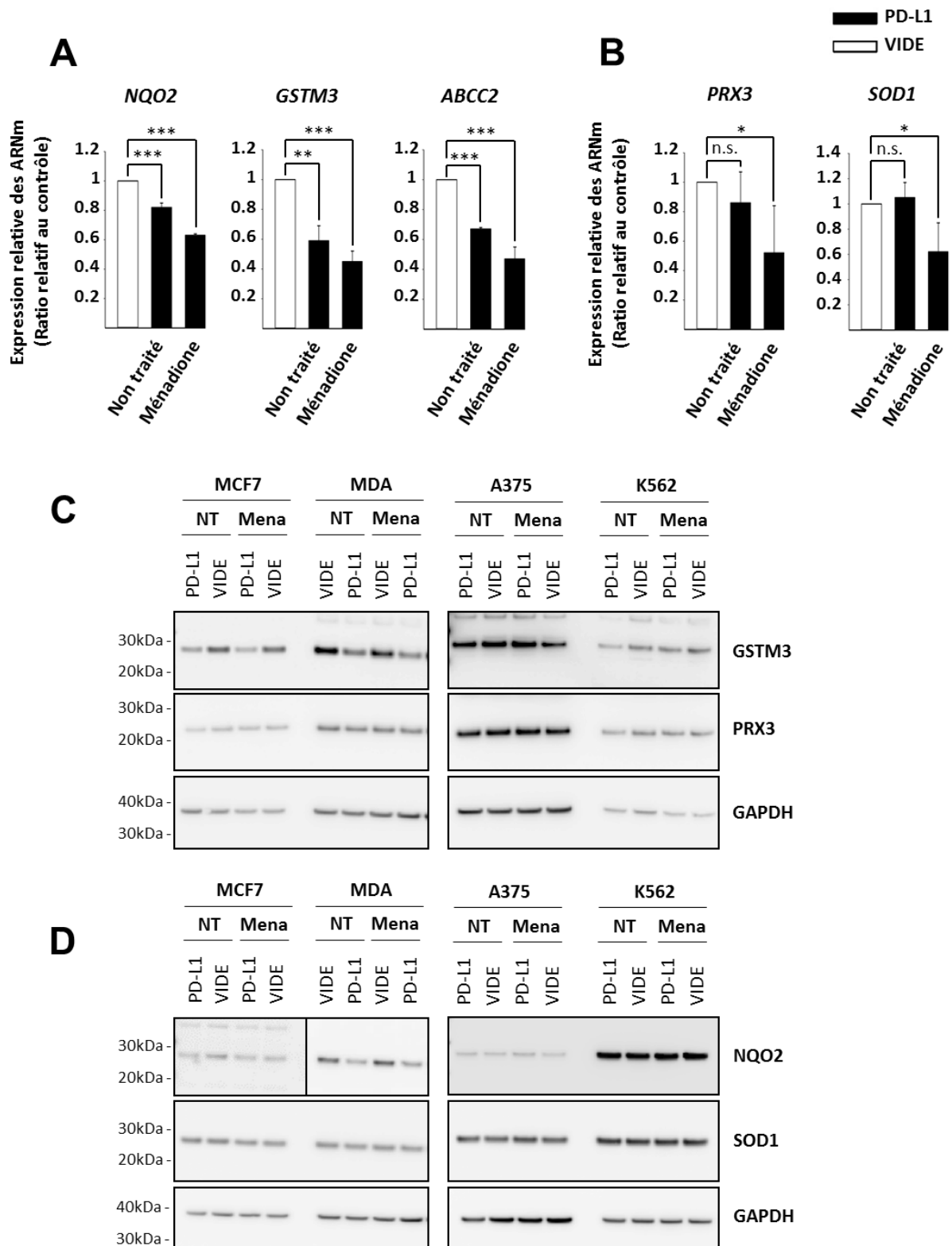


Figure 44: La protéine PD-L1 module l'expression d'effecteurs de la voie NRF2 de réponse au stress oxydant. Les niveaux d'ARNm de NQO2, GSTM3 et ABCC2 (A) ou de PRX3 et SOD1 (B) ont été mesurés en Q-RT-PCR dans les lignées MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 », traitées ou non pendant 3 heures avec 100 μ M de ménadione. Les barres représentent l'expression relative des ARNm dans les cellules MDA-MB-231 « PD-L1 » (barres noires) par rapport aux « VIDE » (représentées par la barre blanche). Les niveaux d'ARNm ont été normalisés avec la GAPDH (gène de référence) ($n = 3$ en triplicat ; moyenne

± l'écart-type ; test de Student, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, non significatif). L'expression des protéines GSTM3, PRX3 (C) et NQO2, SOD1 (D) a été analysée pour les lignées MCF7, A375, K562 « VIDE » et « PD-L1 » ainsi que pour les lignées MDA-MB-231 « VIDE », « PD-L1 ». La GAPDH a été utilisée comme témoin de charge.

Aussi, nous constatons une diminution de l'expression des cibles de NRF2 GSTM3 et NQO2 dans la lignée MDA-MB-231 « PD-L1 » par rapport aux cellules contrôles « VIDE » (**Figures 44C et D**), confirmant les données obtenues en Q-RT-PCR. Toutefois, le traitement à la ménadione n'amplifie pas le différentiel observé. En revanche, contrairement aux résultats obtenus en **Figure 44B**, nous ne remarquons pas de diminution de l'expression de PRX3 et SOD1 dans la lignée MDA-MB-231 « PD-L1 » par rapport à la « VIDE », que ce soit en condition basale de culture ou après traitement à la ménadione.

Concernant les modèles cellulaires A375 et K562 de surexpression de l'isoforme 1 de PD-L1 comparés aux contrôles « VIDE », aucune différence d'expression n'est constatée, et ce, quelle que soit la cible de NRF2 étudiée. S'il en est de même pour les cellules MCF7 dans le cas des protéines PRX3, NQO2 et SOD1, il semblerait toutefois que la surexpression de PD-L1 dans cette lignée engendre une diminution de l'expression du facteur GSTM3 (**Figures 44C et D**). Ainsi, si une réduction de l'expression des cibles de NRF2 est observée dans la lignée MDA-MB-231 suite à l'expression de l'isoforme 1 de PD-L1, cet effet n'est pas systématiquement retrouvé dans les modèles cellulaires testés A375, MCF7 et K562. Aussi, dans le cas présent, nous n'avons pu étudier l'expression de la protéine ABCC2 suite à des problèmes de détection de l'anticorps.

Afin d'aller plus loin, et dans le but de déterminer si la répression des gènes anti-oxydants dans les cellules exprimant PD-L1 est due à une diminution de l'activité de NRF2, nous avons analysé dans les deux lignées, MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 », la localisation sub-cellulaire de ce facteur par microscopie confocale et Western-blot. En effet, NRF2 étant un facteur de transcription, une localisation nucléaire suggérerait une activité transcriptionnelle, alors qu'une localisation cytoplasmique correspondrait plutôt à une forme inactive de cette protéine. Nous constatons en **Figure 45A** une intensité de fluorescence nucléaire de NRF2 plus importante dans la lignée « VIDE » que dans la lignée « PD-L1 ». Celle-ci est augmentée de 22% en condition basale et de respectivement 26% ou 20% après traitement avec un agent pro-oxydant comme la ménadione ou le tH_2O_2 . Cela met en évidence une élévation de la translocation nucléaire de NRF2 en absence de PD-L1, qui n'est toutefois pas amplifiée lors d'un stress oxydatif (**Figure 45A**). Ces résultats ont été confirmés en Western-blot, après analyse de la distribution nucléaire et cytoplasmique du facteur NRF2. Ainsi, **Figure 45B**, nous observons une expression augmentée de NRF2 dans la lignée MDA-MB-231 « VIDE » par rapport à la « PD-L1 » dans les lysats nucléaires, aussi bien en condition basale que suite à un traitement pro-oxydant à la ménadione ou au tH_2O_2 .

Enfin, dans l'objectif de déterminer si la diminution de la localisation nucléaire de NRF2 et la répression de certains de ses gènes cibles dans la lignée « PD-L1 » sont associées à une modulation de la sensibilité à un stress oxydatif, nous avons évalué la production de ROS mitochondriales (mROS) par test MitoSOX dans les deux lignées générées de MDA-MB-231, traitées ou non avec un agent pro-oxydant (**Figure 45C**). La production de mROS se révèle augmentée de 41% ou de 57% dans la lignée exprimant la protéine PD-L1 par rapport à la lignée « VIDE » contrôle, après traitement avec 50 μ M de ménadione ou 500 μ M de tH_2O_2 , respectivement. Ces données suggèrent donc une sensibilité accrue de la lignée MDA-MB-231 « PD-L1 » à un stress oxydatif, pouvant s'expliquer par une diminution de l'activité du facteur NRF2.

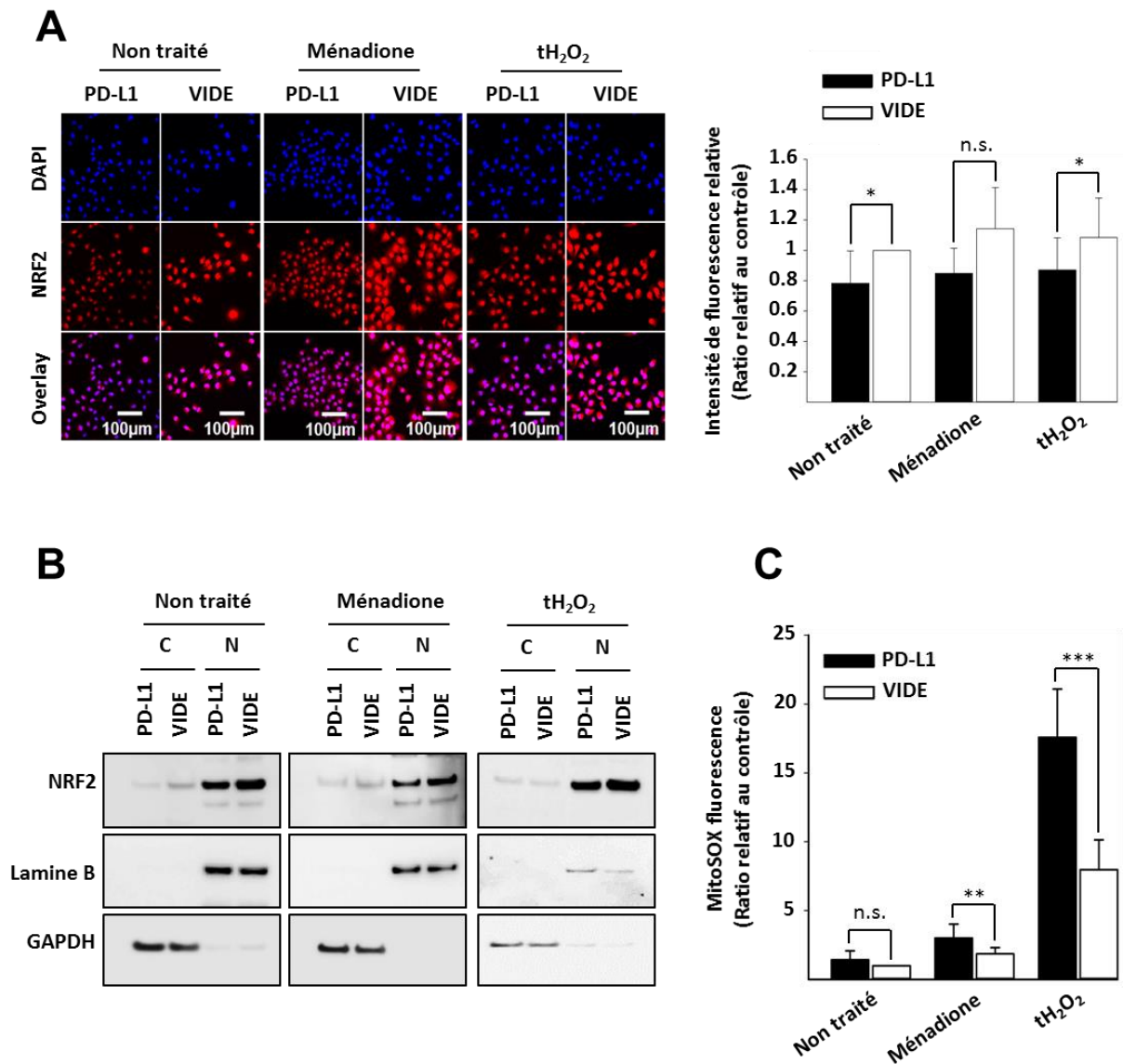


Figure 45: PD-L1 module la localisation nucléaire du facteur NRF2 et la production de ROS. (A) La localisation intracellulaire de NRF2 a été analysée par immunofluorescence dans les lignées MDA-MB-231 « PD-L1 » et « VIDE » traitées ou non avec 100 μ M de ménadione pendant 3 heures ou 500 μ M de tH₂O₂ pendant 16 heures (panel de gauche). Les ratios de l'intensité de fluorescence de NRF2 nucléaire sont représentés sur le panel de droite ($n = 3$; moyenne \pm l'écart-type; test de Student, * $p < 0,05$). (B) Translocation nucléaire de NRF2 étudiée par Western-blot à partir de lysats de protéines cytoplasmiques (« C ») et nucléaires (« N ») issus des lignées « PD-L1 » et « VIDE », traitées comme décrit précédemment. La Lamine B et la GAPDH ont été utilisées comme témoins de charge et de pureté des fractions protéiques. (C) Evaluation de la production de ROS par test MitoSOX par cytométrie en flux, dans ces deux lignées traitées ou non. Les barres représentent les ratios des niveaux de mROS (test de Student; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Les ratios des panels (A, droite) et (C) sont relatifs par rapport à la condition non traité des cellules « VIDE ». n.s., non significatif.

CONCLUSION PARTIE II. Caractérisation phénotypique et transcriptomique de l'impact de PD-L1 dans les cellules tumorales

Après l'obtention des deux lignées de cancer du sein MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 », nous avons voulu les caractériser au niveau phénotypique et transcriptomique.

Premièrement, nous avons montré que l'expression de l'isoforme 1 de PD-L1 provoque une faible mais significative diminution de la croissance des cellules *in vitro*, suite à une augmentation du taux de mortalité basale, aucune différence dans les phases du cycle cellulaire n'ayant été observée. En revanche, PD-L1 favorise la progression tumorale *in vivo* après xélogreffe dans des souris *Nude*. Ces résultats suggèrent ainsi un rôle important du micro-environnement dans ce développement tumoral dépendant de PD-L1.

Dans un second temps, nous avons analysé le kinome et le transcriptome de ces deux lignées en condition basale de culture. Malgré la faible variation du kinome observée en comparant les lignées MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 », il est intéressant de noter que l'expression de PD-L1 diminue le taux de phosphorylation de la protéine p53 au niveau de sa sérine 6. Des expériences de Q-RT-PCR ont par ailleurs confirmé la variation des niveaux d'expression de certains gènes cibles de p53. Si cette voie n'a pas été retrouvée modulée lors de l'analyse du transcriptome, plusieurs voies p53-dépendantes l'ont été, comme la voie de réponse au stress oxydatif NRF2. Afin de valider ces données, nous avons démontré la diminution de la localisation nucléaire du facteur de transcription NRF2 dans les cellules surexprimant PD-L1, suggérant une réduction de son activité transcriptionnelle. Cela va dans le sens de la dérégulation induite par PD-L1 de l'expression des gènes cibles de NRF2 tels que *NQO2*, *GSTM3*, *ABCC2*, validée par Q-RT-PCR et par Western-blot. Par ailleurs, la diminution de la réponse anti-oxydante pourrait expliquer l'élévation de la production de ROS dans la lignée MDA-MB-231 « PD-L1 » par rapport aux cellules contrôles « VIDE ».

Enfin, l'impact de l'isoforme 1 de PD-L1 sur les effecteurs de NRF2 n'a pas été retrouvé dans tous nos modèles cellulaires MCF7, A375 et K562 de surexpression de cette protéine, seule une diminution de l'expression de *GSTM3* ayant été mise en évidence dans le cas des cellules MCF7 « PD-L1 » par rapport aux « VIDE ». Aussi, ces données laissent penser à un mode de régulation plus complexe entre la protéine PD-L1 et la voie de réponse au stress oxydatif NRF2.

PARTIE III. Modulation du métabolisme suite à l'expression de PD-L1

Complémentairement à son rôle dans la réponse à un stress oxydatif, le facteur NRF2 a été plus récemment décrit comme un régulateur du métabolisme des cellules cancéreuses. Son activation augmenterait le phénomène de phosphorylation oxydative (ou respiration mitochondriale), alors qu'à l'inverse, son inhibition favoriserait la glycolyse. De ce fait, nous avons voulu caractériser le métabolisme des cellules MDA-MB-231 « PD-L1 » et « VIDE », et notamment les processus de phosphorylation oxydative (ou OCR, *Oxygen Consumption Rate*) et de glycolyse (ou ECAR, *Extracellular Acidification Rate*), en utilisant l'équipement Seahorse® (*Seahorse Bioscience*).

1. Impact de PD-L1 sur le métabolisme des cellules MDA-MB-231

1.1. Etude fonctionnelle du métabolisme

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'analyse de la phosphorylation oxydative ou OCR (*Oxygen Consumption Rate*). En **Figure 46**, nous observons des taux de consommation d'oxygène supérieurs dans la lignée MDA-MB-231 « VIDE », par rapport aux cellules « PD-L1 ». L'injection de divers composés lors de cette expérience au Seahorse® permet de déterminer leur consommation selon différents états, listés ci-dessous :

- Respiration mitochondriale basale : correspondant à la la consommation d'oxygène nécessaire pour subvenir aux besoins en ATP.
- Respiration maximale : mesurée après traitement au FCCP (*Carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy) phenylhydrazone*), agent découplant, qui dissipe le gradient de protons. La consommation mesurée reflète la capacité maximale de fonctionnement de la chaîne respiratoire.
- Production d'ATP : ATP produit par les mitochondries en réponse à la demande énergétique. La diminution du taux de consommation en oxygène survenant après injection d'oligomycine (inhibiteur d'ATP synthase, complexe V de la CRM) représente la portion de la respiration basale utilisée pour produire de l'ATP.
- Perte de protons (H⁺) : portion de respiration basale restante non couplée à la production d'ATP.
- Capacités de réserve : capacités de réponse à une demande énergétique correspondant aux capacités respiratoires théoriques maximales.

Aussi, nous avons comparé ces différents états de consommation d'oxygène entre les deux lignées « PD-L1 » et « VIDE ». Nous observons en **Figure 46** une diminution respective de 30%, 14%, 32% et 24% de la respiration basale, de la respiration maximale, de la production d'ATP et de la perte de protons, pour la lignée MDA-MB-231 « PD-L1 » par rapport à la « VIDE ». Aucune différence n'est constatée au niveau des capacités de réserve.

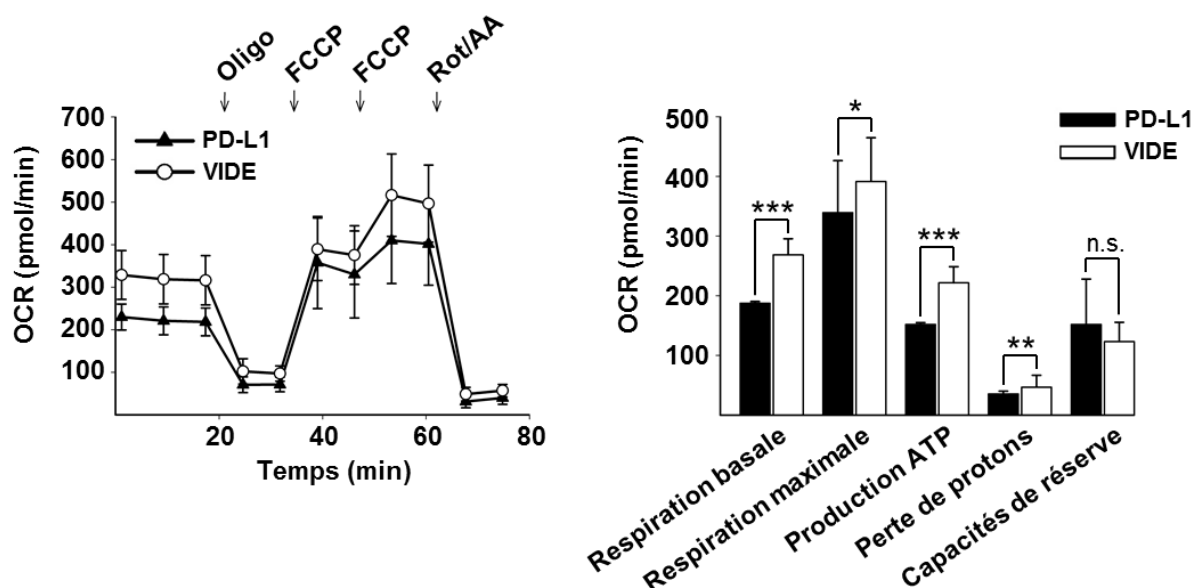


Figure 46: L'expression de PD-L1 diminue la phosphorylation oxydative des cellules MDA-MB-231. Le Seahorse XF-24 Extracellular flux analyzer a été utilisé afin d'évaluer l'OCR des cellules MDA-MB-231 « PD-L1 » et « VIDE ». (panel de gauche) 1 μ M oligomycine (Oligo), 0,25-0,5 μ M Carbonyl cyanide 4-(trifluorométhoxy) phenylhydrazine (FCCP), et 1 μ M rotenone (Rot) avec 1 μ M antimycine A (AA) ont été injectés séquentiellement pour mesurer l'OCR. (panel de droite) Les barres noires (lignée "PD-L1") et blanches (lignée "VIDE") représentent les taux de respiration basale (OCR après injection Rot/AA soustraite à l'OCR de départ), de respiration maximale (OCR après injection Rot/AA soustraite à l'OCR induite après injection de FCCP), de production d'ATP (OCR après injection d'oligomycine soustraite à l'OCR de départ), de perte de protons (OCR après injection Rot/AA soustraite à l'OCR induite par l'oligomycine) et des capacités de réserve (OCR de départ soustraite à l'OCR après injection de FCCP) ($n = 3$, moyenne \pm l'écart-type ; Mann-Whitney Rank Sum test ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, non significatif).

A l'inverse de la phosphorylation oxydative, l'étude de la glycolyse ou ECAR (Extracellular Acidification Rate) à l'aide du Seahorse® indique une élévation de ce phénomène dans la lignée MDA-MB-231 « PD-L1 » par rapport à la lignée « VIDE » (**Figure 47**). L'addition de divers agents lors de cette expérience permet de mesurer plusieurs caractéristiques :

- **Glycolyse** : processus de conversion du glucose en pyruvate, mesuré après ajout de glucose en quantité saturante.

- Capacités glycolytiques : taux de glycolyse maximum d'une cellule mesuré après addition d'oligomycine, inhibiteur de la phosphorylation oxydative, conduisant les cellules à utiliser la voie de la glycolyse à son maximum.
- Réserves glycolytiques : capacités de réponse à une demande énergétique correspondant aux fonctions glycolytiques théoriques maximales.

Enfin, l'injection de l'analogue du glucose 2-DG (*2-deoxy-glucose*), inhibe la glycolyse en entrant en compétition avec les molécules de glucose pour se lier à l'Hexokinase, première enzyme de la voie glycolytique.

La **Figure 47A** met en évidence une élévation de l'activité ECAR des cellules « PD-L1 » par rapport aux « VIDE », avec une augmentation respective de 36%, 32% et 30% de la glycolyse, des capacités glycolytiques et des réserves glycolytiques. D'autre part, comparée aux cellules MDA-MB-231 « VIDE », la lignée « PD-L1 » présente un taux de consommation de glucose accentuée de 33%, ainsi qu'une production de lactate augmentée de 41% (**Figure 47B**), confirmant les résultats obtenus au Seahorse® (**Figure 47A**).

Pour conclure, ces données indiquent donc une diminution de la phosphorylation oxydative induite par l'expression de PD-L1, ainsi qu'une exacerbation du processus de glycolyse.

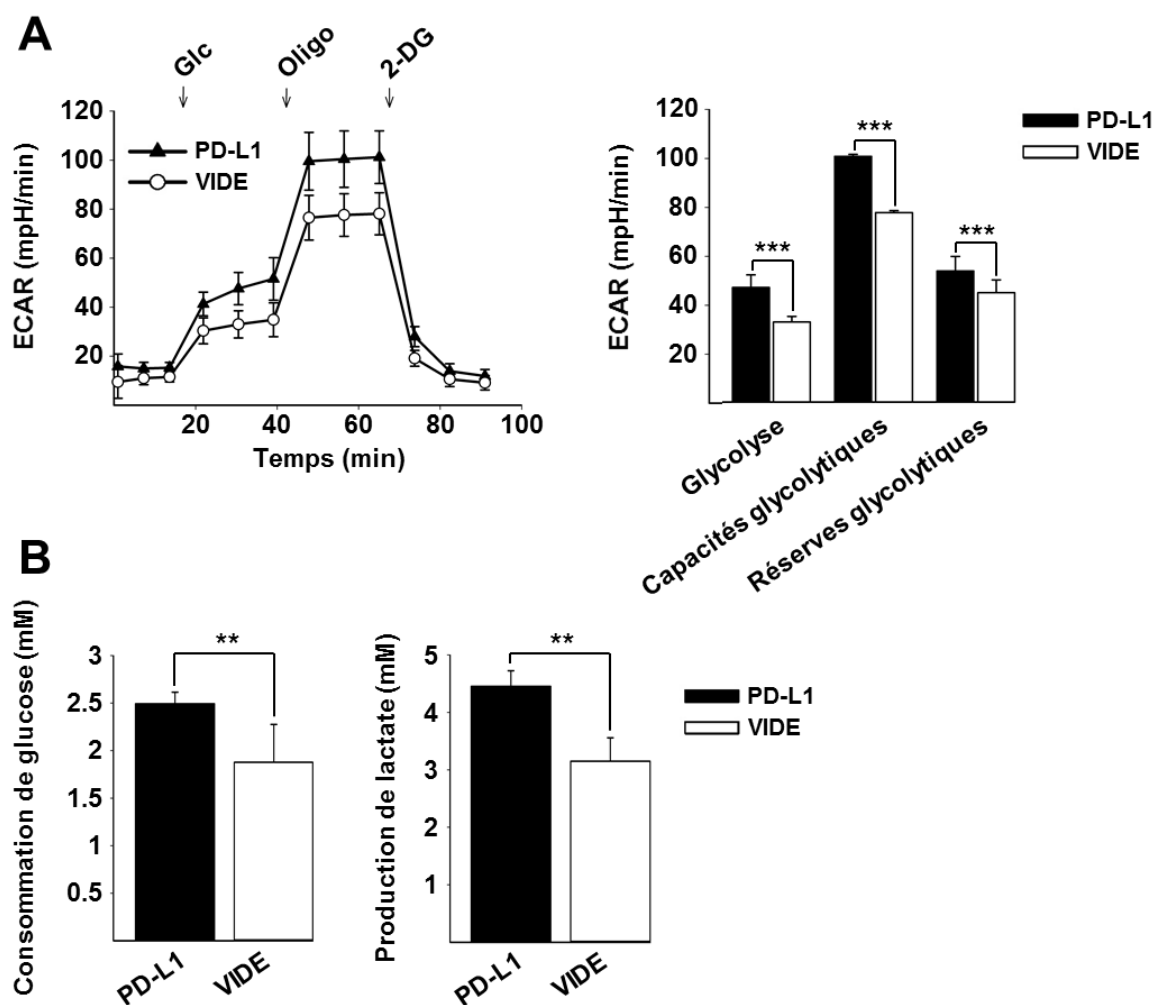


Figure 47: L'expression de PD-L1 augmente la glycolyse des cellules MDA-MB-231. Le Seahorse XF-24 Extracellular flux analyzer a été utilisé afin d'analyser l'ECAR des cellules MDA-MB-231 « PD-L1 » et « VIDE ». **(A, gauche)** Pour mesurer l'ECAR, 10 mM glucose (Glc), 1 μ M oligomycine (Oligo) et 100 mM 2-DG (2-Deoxy-D-Glucose) ont été injectés dans les puits à des temps différents. **(A, droite)** Les barres représentent les niveaux de glycolyse (ECAR induite suite à l'ajout de glucose), des capacités glycolytiques (ECAR après ajout de 2-DG soustraite à l'ECAR après oligomycine) et des réserves glycolytiques (ECAR après 2-DG soustraite à l'ECAR induite après injection de glucose). Les activités glycolytiques des cellules « PD-L1 » sont significativement plus importantes que celles de la lignée « VIDE » ($n = 5$, moyenne \pm l'écart-type ; Mann-Whitney Rank Sum test ; *** $p < 0,001$). **(B)** Les barres noires et blanches représentent la consommation de glucose (panel de gauche) et la production de lactate (panel de droite), déterminées à partir de surnageants de 24 heures de culture en condition basale, dans les cellules « PD-L1 » et « VIDE » ($n = 3$, moyenne \pm l'écart-type ; test de Student ; ** $p < 0,01$).

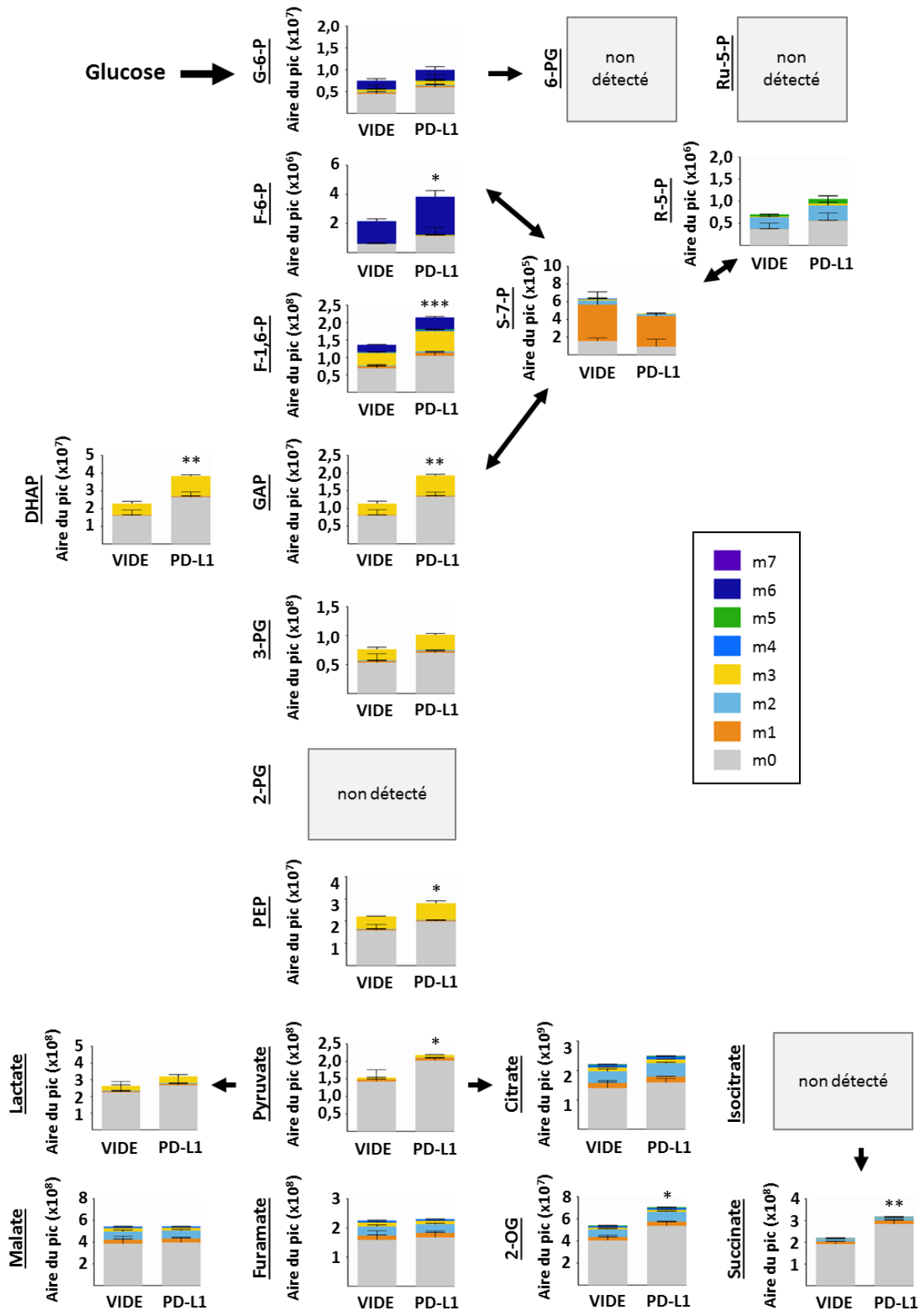
1.2. Validation par analyse métabolomique

1.2.1. Voie de la glycolyse

Afin de valider les fonctions métaboliques de la protéine PD-L1, nous avons étudié le profil métabolique des deux lignées MDA-MB-231, par analyse métabolomique réalisée par

la plateforme *VIB Metabolomics Core* de l'Université KU Leuven (**Figure 48**). Cette expérience a permis de confirmer l'augmentation de l'activité glycolytique dans la lignée « PD-L1 » par rapport à la « VIDE », avec une élévation significative des niveaux des intermédiaires de cette voie, tels que le F-6-P, le F-1,6-P, le GAP, le DHAP, le PEP et le pyruvate de respectivement 77%, 58%, 70%, 68%, 27% et 42%. Notons qu'une tendance à l'augmentation est observée pour les autres métabolites de la voie de la glycolyse comme le G-6-P (de 33%), le 3-PG (de 33%) et le lactate (de 22%), dans la lignée exprimant la protéine PD-L1. Concernant les métabolites du cycle de Krebs, seuls les deux métabolites succinate et 2-OG présentent des niveaux plus élevés de 44% et 30% dans la lignée « PD-L1 », les trois autres détectés (le citrate, le fumarate et le malate) n'étant pas modifiés (**Figure 48**). Cette analyse confirme donc les résultats précédemment obtenus, montrant une exacerbation de la voie de la glycolyse induite par la protéine PD-L1, et représentant une propriété intrinsèque de cette molécule.

Figure 48: L'expression de PD-L1 module le profil métabolomique des cellules MDA-MB-231. Les lignées MDA-MB-231 « PD-L1 » et « VIDE » ont été cultivées pendant 24 heures dans un milieu contenant du D-[U-¹³C]-glucose puis le profil métabolomique des voies de la glycolyse et du cycle TCA a été analysé. Les barres représentent l'aire du pic obtenu en spectrométrie de masse et correspondent aux taux de métabolites et n'ayant aucun carbone marqué au ¹³C (m0), ou 1 (m1), 2 (m2), 3 (m3), 4 (m4), 5 (m5), 6 (m6) ou 7 (m7) carbones marqués. Les échantillons ont été analysés en triplicat ; la moyenne ± l'écart-type est représentée (test de Student ; * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001).
2-OG, 2-oxoglutarate; 2PG, 2-phosphoglycerate; 3PG, 3-phosphoglycerate; 6-PG, 6-phosphogluconate; DHAP, dihydroxyacétone phosphate; F1,6P, fructose 1,6-bis-phosphate; F6P, fructose-6-phosphate; G6P, glucose 6-phosphate; GAP, glyceraldehyde 3-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; R5P, ribose 5-phosphate; Ru5P, ribulose 5-phosphate; S7P, sedoheptulose-7-phosphate.



1.2.2. Production de nucléotides et acides aminés

L'analyse métabolomique a également permis de mettre en évidence une tendance à l'augmentation de la production de nucléotides (molécules organiques composées d'une base nucléique, d'un pentose et de un à trois groupes phosphate) et d'acides aminés dans la lignée « PD-L1 » par rapport à la lignée « VIDE ». En effet, **Figure 49**, nous constatons que les ribonucléotides comme l'UTP, le CTP, l'AMP, l'ADP, l'ATP et le GTP présentent des taux respectifs augmentés de 39%, 34%, 41%, 22%, 45% et 46% lorsque la protéine PD-L1 est exprimée, les deux dernières valeurs étant significatives. Les niveaux du désoxyribonucléotide TTP ne sont pas modulés entre les deux lignées. Par ailleurs, les taux d'acides aminés Glycine, Alanine et Sérine seraient pareillement accentués de 36%, 26% et 31%, bien que les valeurs soient à la limite de la significativité (**Figure 49**).

En d'autres termes, cette expérience de métabolomique a donc permis de confirmer une voie glycolytique accentuée dans la lignée « PD-L1 » par rapport à la « VIDE », ainsi qu'une tendance à l'augmentation des niveaux de nucléotides et d'acides aminés. Toutefois, une expérience supplémentaire est nécessaire afin d'améliorer les résultats statistiques et pouvoir réellement conclure.

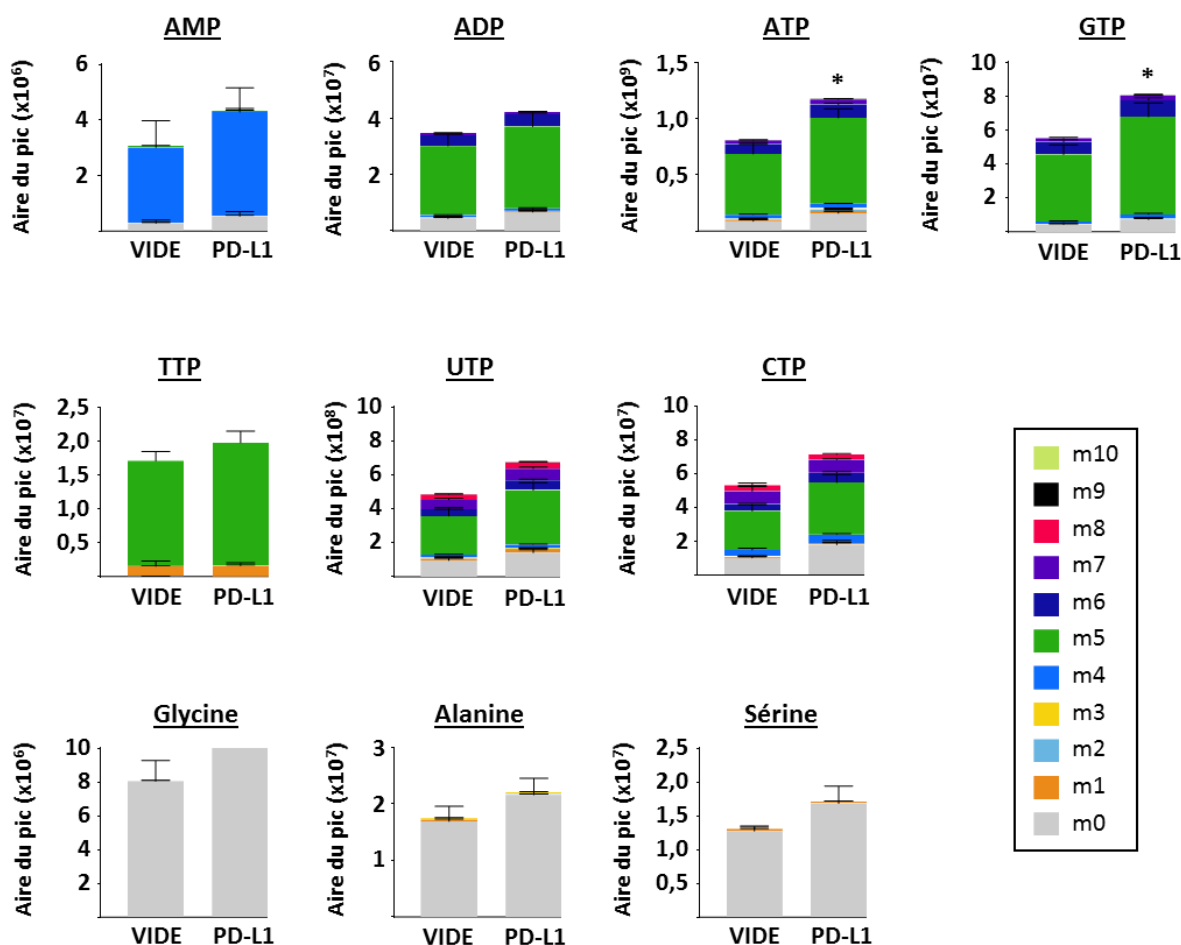


Figure 49: La protéine PD-L1 module les taux de nucléotides et d'acides aminés. Les cellules MDA-MB-231 « PD-L1 » et « VIDE » ont été cultivées pendant 24 heures dans un milieu contenant du D-[U- ^{13}C]-glucose puis le profil métabolomique des niveaux de nucléotides et d'acides aminés a été analysé. Les barres représentent l'aire du pic obtenu en spectrométrie de masse et correspondent aux taux de métabolites n'ayant aucun carbone marqué au ^{13}C (m0), ou 1 (m1), 2 (m2), 3 (m3), 4 (m4), 5 (m5), 6 (m6), 7 (m7), 8 (m8), 9 (m9) ou 10 (m10) carbones marqués. Les échantillons ont été analysés en triplicat ; la moyenne \pm l'écart-type est représentée (test de Student ; * $p < 0,05$). La significativité est presque atteinte pour l'UTP, le CTP, la Glycine et la Sérine ($p = 0,06$; $p = 0,09$; $p = 0,08$ et $p = 0,06$, respectivement).

AMP, Adénosine monophosphate ; ADP, Adénosine diphosphate ; ATP, Adénosine triphosphate ; GTP, Guanosine triphosphate ; TTP, Thymidine triphosphate ; UTP, Uridine triphosphate ; CTP, Cytidine triphosphate.

1.3. Lien potentiel entre la modulation du métabolisme par PD-L1 et HIF-1 α ?

Il a été décrit qu'une élévation des taux intracellulaires de ROS due à une diminution de l'activité NRF2 peut conduire à la stabilisation de la sous-unité α du facteur HIF-1, celui-ci étant connu pour favoriser un métabolisme glycolytique ^{52,405,148}.

Ce phénomène est observé dans les cellules « PD-L1 » traitées au CoCl_2 pendant 24 heures, agent mimant l'hypoxie (**Figure 50A**). De plus, et comme attendu, un traitement au

MG132, inhibiteur du protéasome, amplifie cette stabilisation de HIF-1 α en empêchant sa dégradation protéasomale. La stabilisation de ce facteur est donc plus importante lorsque PD-L1 est exprimée. La protéine HIF-1 α étant un facteur de transcription, sa forme active est donc nucléaire, à l'inverse de sa forme inactive cytoplasmique. Les Western-blot présentés en **Figure 50A** ayant été réalisés à partir de lysats totaux, nous avons ensuite voulu distinguer les formes cytoplasmique et nucléaire de la protéine HIF-1 α dans les deux lignées de MDA-MB-231. Ainsi, **Figure 50B**, nous n'observons pas de différence d'expression entre les lignées « VIDE » et « PD-L1 » en condition basale de culture. En revanche, un traitement au CoCl₂ engendre une augmentation des formes cytoplasmique et nucléaire de HIF-1 α dans la lignée « PD-L1 » par rapport à la lignée « VIDE », suggérant une élévation de l'activité de ce facteur.

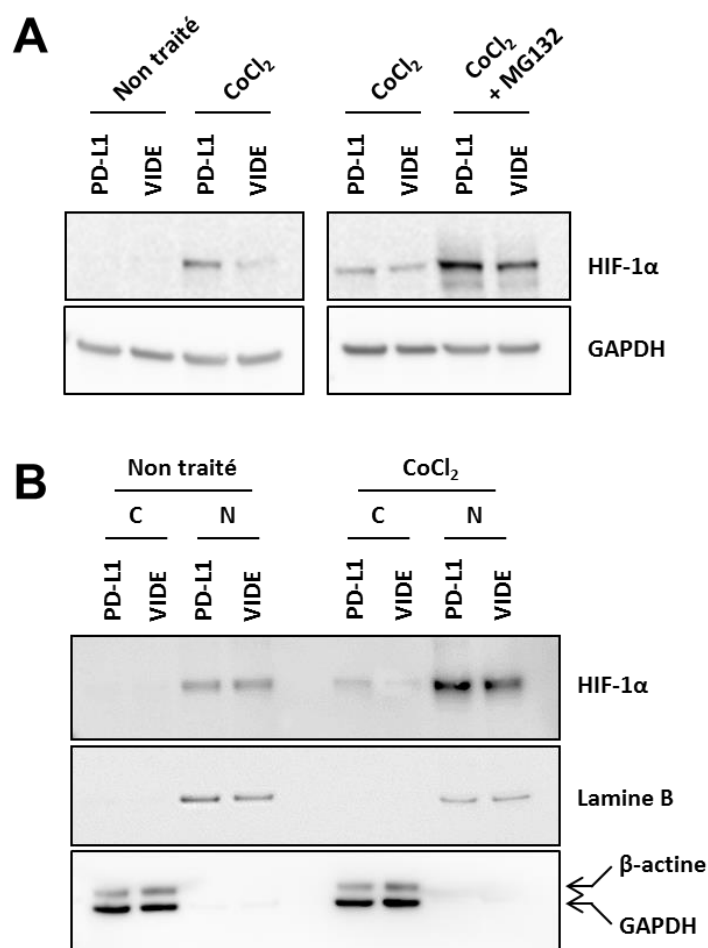


Figure 50: L'expression de PD-L1 induit la stabilisation de HIF-1 α en condition mimant l'hypoxie dans les cellules cancéreuses de sein MDA-MB-231. La stabilisation du facteur HIF-1 α a été évaluée par Western-blot des extraits totaux (**A**) ou cytoplasmique (« C ») et nucléaire (« N ») (**B**) des cellules « PD-L1 » et « VIDE ». Comme indiqué, ces cellules ont été cultivées en condition basale ou avec 200 μ M de CoCl₂, agent mimant l'hypoxie, et traitées ou non avec 20 μ M de MG132 pendant 3 heures. La Lamine B, la GAPDH et la β -actine ont été utilisées comme témoins de charge.

1.4. Ces différences métaboliques observées *in vitro* sont-elles présentes *in vivo* ?

Afin de déterminer si les modulations de la voie NRF2 et de la glycolyse présentes *in vitro* le sont également *in vivo*, nous avons réalisé des Q-RT-PCR à partir d'extraits des tumeurs « PD-L1 » et « VIDE » obtenues chez la souris (**Figure 38, p. 170**). En **Figure 51**, nous constatons que les niveaux d'ARNm des gènes cibles de NRF2 tels que *ABCC2*, *GSTM3* et *NQO2* sont significativement diminués de respectivement 44%, 19% et 18%, dans les tumeurs « PD-L1 » comparées aux « VIDE ». Par ailleurs, l'expression de PD-L1 provoque une élévation des taux d'ARNm des transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT3 de 93% et 128% par rapport aux tumeurs contrôles. Ces transporteurs sont connus pour être des gènes cibles du facteur HIF-1, de même que LDHA et PDHK1, ce dernier étant également surexprimé de 56% dans les tumeurs « PD-L1 ».

En outre, ces données *in vivo* confirment nos données obtenues *in vitro* indiquant une diminution de la voie NRF2 ainsi qu'une augmentation de la glycolyse, possiblement liée à une stabilisation accentuée de HIF-1 α dans les tumeurs « PD-L1 ». Ces modulations métaboliques pourraient expliquer la tumorigénicité plus importante des cellules exprimant PD-L1 observée en **Figure 38, p.170**.

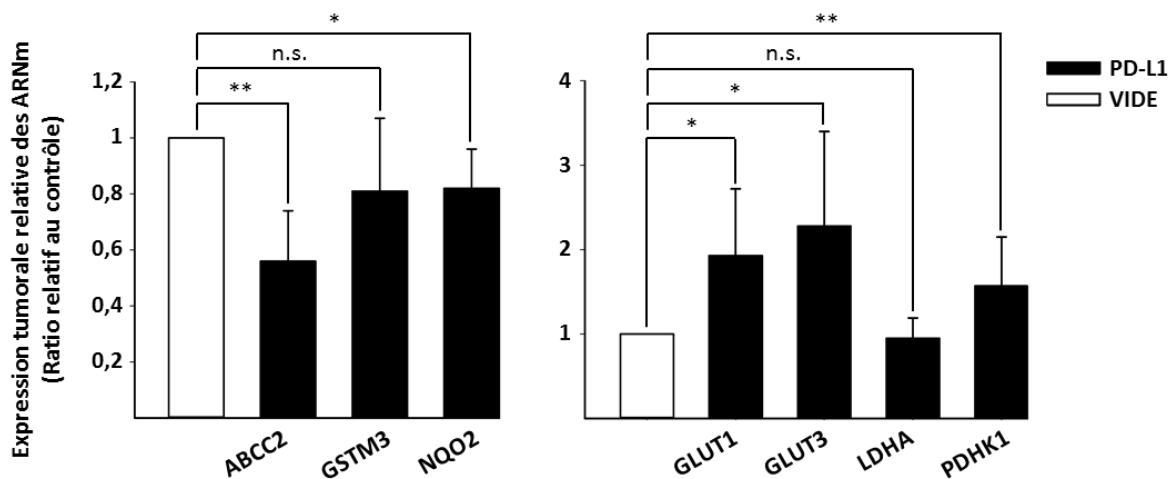


Figure 51: PD-L1 module l'expression de gènes cibles de NRF2 et HIF-1 α *in vivo*. Les niveaux d'ARNm des gènes cibles de NRF2 *ABCC2*, *GSTM3* et *NQO2* (panel de gauche) et de HIF-1 α *GLUT1*, *GLUT3*, *LDHA* et *PDHK1* (panel de droite) ont été mesurés par Q-RT-PCR à partir de tumeurs issues de souris injectées avec les cellules MDA-MB-231 « PD-L1 » et « VIDE ». Les barres représentent l'expression relative des ARNm dans les tumeurs « PD-L1 » (barres noires) par rapport aux tumeurs « VIDE » (représentées par la barre blanche). Les niveaux d'ARNm ont été normalisés avec la *GAPDH* (gène de référence) ($n = 4-5$, en triplicat ; moyenne \pm l'écart-type ; Mann-Whitney Rank Sum test ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; n.s., non significatif).

2. Etude du rôle de PD-L1 dans d'autres lignées cellulaires

Toutes ces données ayant été obtenues à partir des lignées de MDA-MB-231 modifiées par *genome editing*, nous avons voulu confirmer ces modulations du métabolisme sur nos modèles cellulaires de surexpression de PD-L1, MCF7 et A375. En **Figure 52**, nous pouvons constater des niveaux de glycolyse similaires entre les lignées surexprimant l'isoforme 1 de PD-L1 et les lignées contrôles. En effet, les courbes se superposent parfaitement pour les deux lignées de cellules A375. Concernant les cellules de sein MCF7, nous observons une légère différence avant même l'injection de glucose dans le milieu, signifiant que ce taux d'acidification extracellulaire mesuré n'est pas dû à la consommation de glucose par les cellules. Nous ne pouvons pas conclure quant à une élévation de la glycolyse des cellules surexprimant PD-L1 dans ce cas.

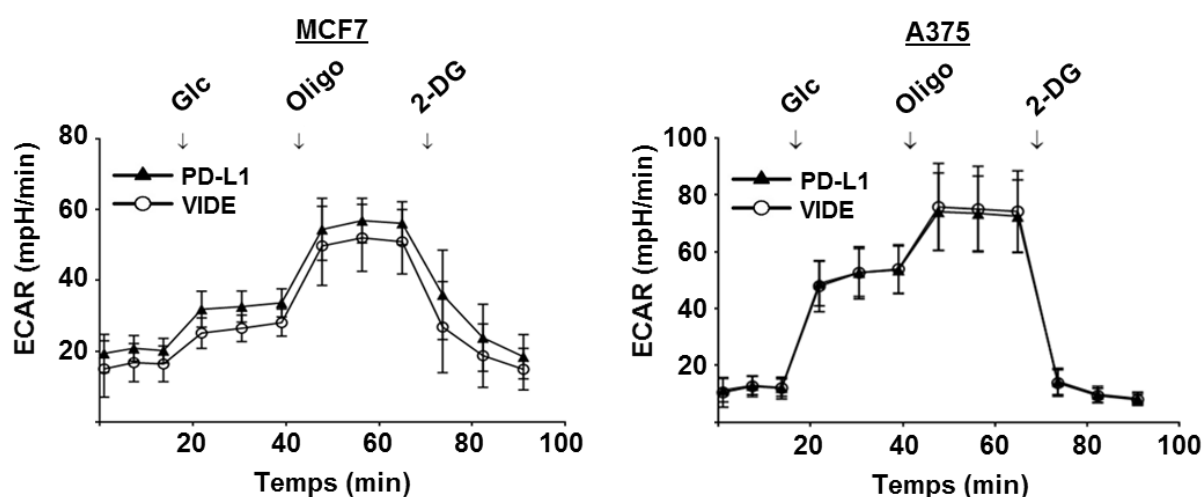


Figure 52: La surexpression de PD-L1 ne module pas la glycolyse des cellules MCF7 ni des A375. Le Seahorse XF-24 Extracellular flux analyzer a été utilisé pour évaluer l'ECAR des cellules MCF7 et A375 « PD-L1 » et « VIDE ». Pour mesurer l'ECAR, 10 mM glucose (Glc), 1 μ M oligomycine (Oligo) et 100 mM 2-DG (2-Deoxy-D-Glucose) ont été injectés dans les puits à des temps différents ($n = 3$, moyenne \pm l'écart-type). Aucune différence d'activité glycolytique n'est observée entre les cellules « PD-L1 » et « VIDE » pour ces deux lignées.

Dans un second temps, la phosphorylation oxydative a été analysée. Les données obtenues suggèrent qu'une surexpression de PD-L1 engendre une élévation de la phosphorylation oxydative dans les lignées MCF7 et A375 (**Figure 53A et B**, respectivement). En effet, nous notons une augmentation respective de 20%, 39% et 34% des taux de respiration cellulaire maximale, de perte de protons et des capacités de réserve, pour les cellules MCF7 surexprimant PD-L1 par rapport aux cellules contrôles. Similairement, les cellules A375 « PD-L1 » présentent des niveaux de respiration basale et maximale accentués de 30% et de 61% par rapport à la lignée « VIDE ».

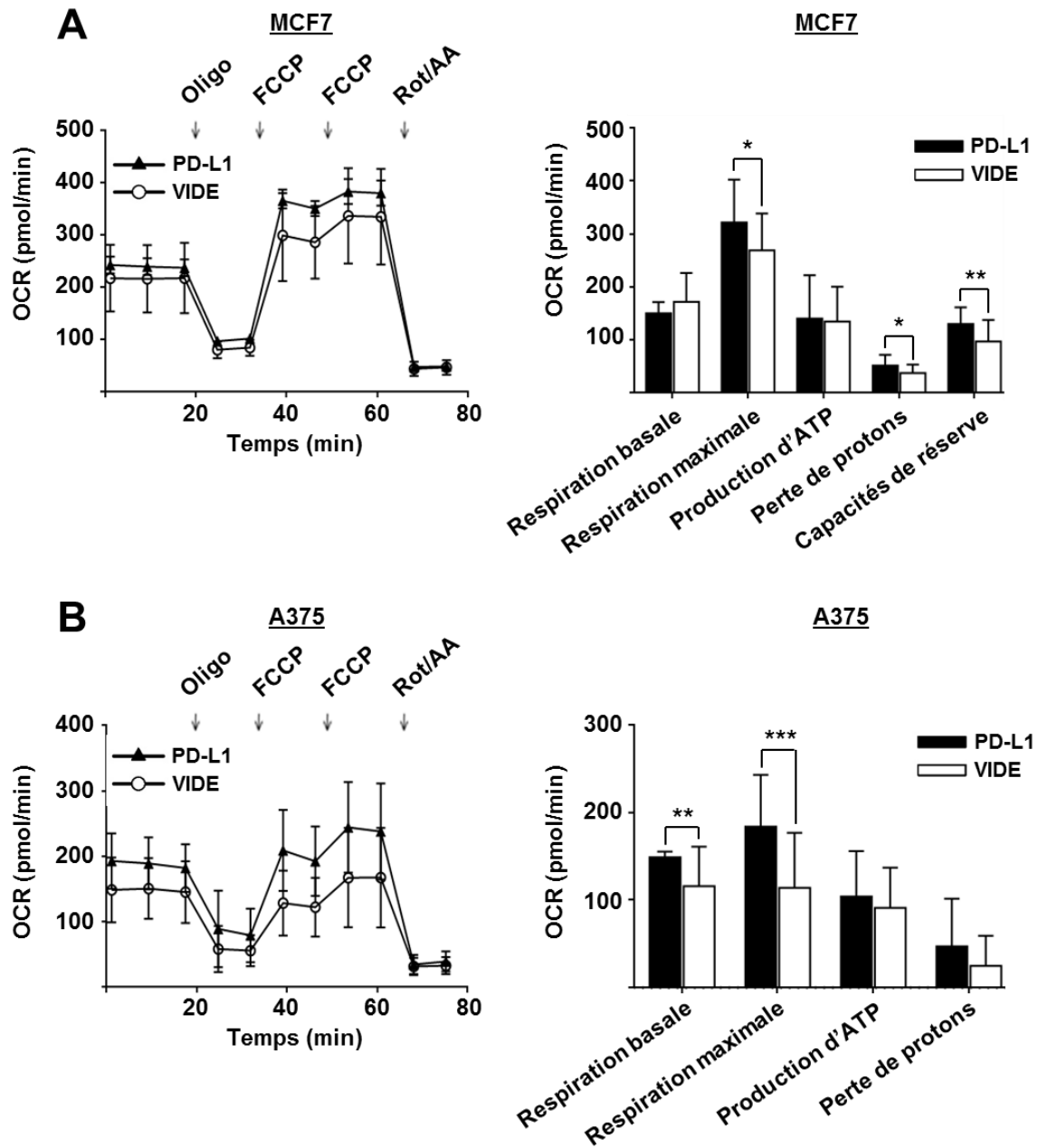


Figure 53: La surexpression de PD-L1 augmente la phosphorylation oxydative des cellules MCF7 et A375. Le Seahorse XF-24 Extracellular flux analyzer a été utilisé pour évaluer l'OCR des cellules MCF7 (A) et A375 (B) « PD-L1 » et « VIDE ». (Panels de gauche) 1 μ M oligomycine (Oligo), 0,25-0,5 μ M Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazine (FCCP), et 1 μ M rotenone (Rot) avec 1 μ M antimycine A (AA) ont été injectés séquentiellement pour mesurer l'OCR ($n = 3$, moyenne \pm l'écart-type). (Panels de droite) Les barres noires (lignée « PD-L1 ») et blanches (lignée « VIDE ») représentent les taux de respiration basale, de respiration maximale, de production d'ATP, de perte de protons et pour les MCF7, des capacités de réserve. Test de Student pour les MCF7 et Mann-Whitney Rank Sum test pour les A375 ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; n.s., non significatif.

3. Analyse *in silico* de databases de patients atteints de cancer du sein

3.1. Corrélation entre l'expression de *PD-L1/CD274* et divers gènes impliqués dans le métabolisme

La lignée cancéreuse de sein MDA-MB-231 dérive d'une tumeur triple négative TNBC. Aussi, afin d'explorer plus en détails la corrélation entre PD-L1, les gènes cibles de NRF2 et la voie de la glycolyse, nous avons analysé à partir de la base de données *NCBI Gene Expression Omnibus* (GEO), trois bases de données contenant les résultats microarrays de 327⁵⁵⁸, 266⁵⁵⁹ et 153⁵⁶⁰ échantillons issus de patients atteints de cancer du sein, respectivement.

Nous avons tout d'abord évalué l'expression du gène *PD-L1/CD274* dans les cancers TNBC par rapport aux autres sous-types tumoraux et aux individus sains. Comme précédemment rapporté, les tumeurs TNBC expriment plus fortement l'ARNm *PD-L1/CD274* que les autres sous-types²⁵³, validant de ce fait les bases de données utilisées (**Figure 54A**). Dans un second temps, et pour chaque échantillon de patient, nous nous sommes intéressés à la corrélation entre l'expression des gènes *PD-L1/CD274*, des gènes cibles de NRF2 et de gènes de la glycolyse. Ainsi, nous avons mis en évidence une corrélation positive entre l'expression de l'ARNm *PD-L1/CD274* et : *i*) l'expression des transporteurs de glucose *SLC2A1/GLUT1* et *SLC2A3/GLUT3*, gènes cibles de HIF-1 (**Figure 54B**), *ii*) l'expression de *PDHK1*, également cible de HIF-1 et impliquée dans la glycolyse (**Annexe 6**) et *iii*) l'expression de *CYBB*, lié à la production intracellulaire de ROS (**Figure 54B**). D'autre part, une corrélation négative entre l'expression des ARNm *GSTM3*, gène cible de NRF2 et *PD-L1/CD274* est observée. Cela confirme donc nos précédents résultats (**Figure 44, p. 180**). Notons toutefois que les données obtenues *in vitro* et *in vivo* ne sont pas toutes retrouvées *in silico*, aucune corrélation n'étant observée entre l'expression de *PD-L1/CD274* et celle des gènes *NQO2* et *ABCC2* (**Annexe 6**).

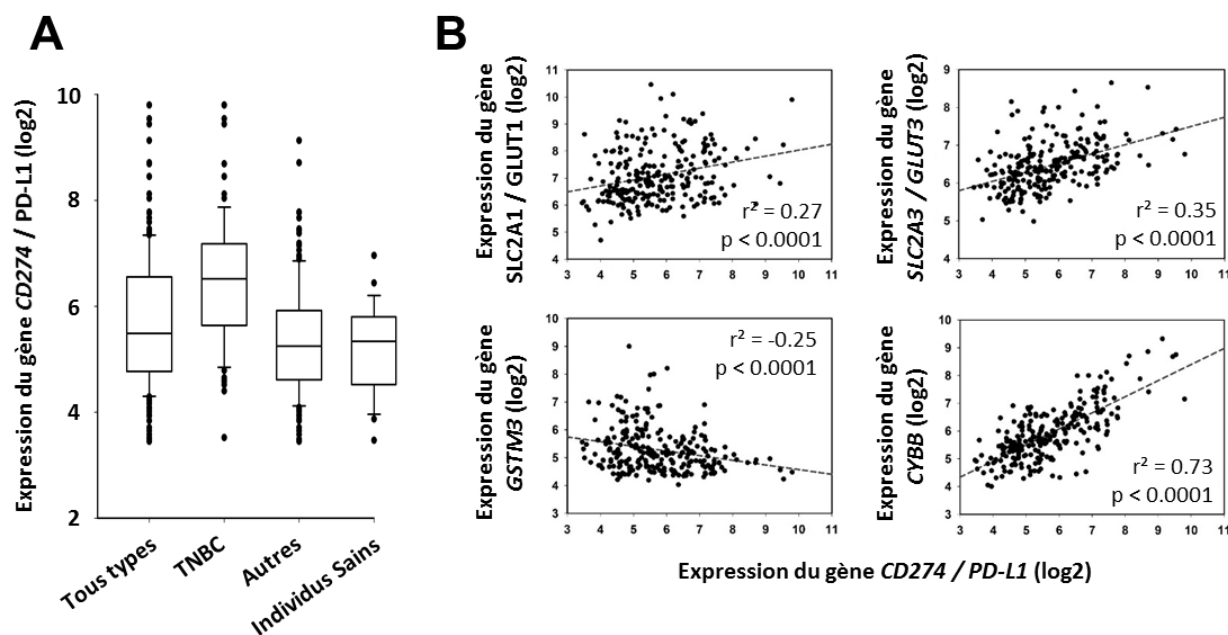


Figure 54: Analyse in silico de cohortes de patients atteints de cancer du sein, confirmant l'effet de PD-L1 sur le métabolisme. (A) Expression de l'ARNm de PD-L1/CD274 (\log_2) représentée sous forme de boxplot, dans tous les sous-types de cancers du sein ($n = 242$ échantillons), les cancers triples négatifs TNBC ($n = 75$), les autres sous-types correspondant aux Luminal A, Luminal B et HER2 ($n = 169$) ou dans des échantillons issus d'individus sains ($n = 24$). Données provenant de la base de données GSE21653. (B) Nuage de points représentant les corrélations entre l'expression des transporteurs de glucose (SLC2A1/GLUT1 ou SLC2A3/GLUT3) ou des gènes liés au métabolisme oxydatif (GSTM3 ou CYBB) avec l'expression du gène PD-L1/CD274 (\log_2). Les corrélations sont évaluées par le coefficient de Pearson (r^2) et la p -value (p).

3.2. Elargissement de l'analyse à d'autres membres de la famille B7

D'autres membres de la famille B7 possédant des fonctions intrinsèques, nous avons étendu notre analyse *in silico* à certaines de ces molécules, telles que B7-H3/CD276, B7-H4, PD-L1, CD80/B7-1 et CD86/B7-2, afin de déterminer si la modulation du métabolisme cellulaire observée pourrait provenir d'un effet de classe. Nous pouvons observer, **Figure 55A** et **Annexe 6**, que les gènes SLC2A3/GLUT3, CYBB et PDHK1 ont leur expression positivement corrélée à celles de CD80/B7-1, CD86/B7-2 et PD-L2, mais pas de B7-H3/CD276 ou B7-H4. D'autre part, ces mêmes molécules CD80/B7-1, CD86/B7-2 et PD-L2 ont l'expression de leurs gènes négativement corrélée avec celle de GSTM3 (**Figure 55A** et **Annexe 6**). Il est intéressant de noter que similairement à PD-L1, les tumeurs TNBC expriment de manière plus importante les membres CD80/B7-1 et CD86/B7-2 que les autres sous-types de cancers du sein (**Figure 55B**). Ces corrélations entre l'expression de gènes de la famille B7 et de gènes de la voie de la glycolyse ou du stress oxydatif, suggèrent l'existence d'un lien entre les *immune checkpoints* et le métabolisme tumoral.

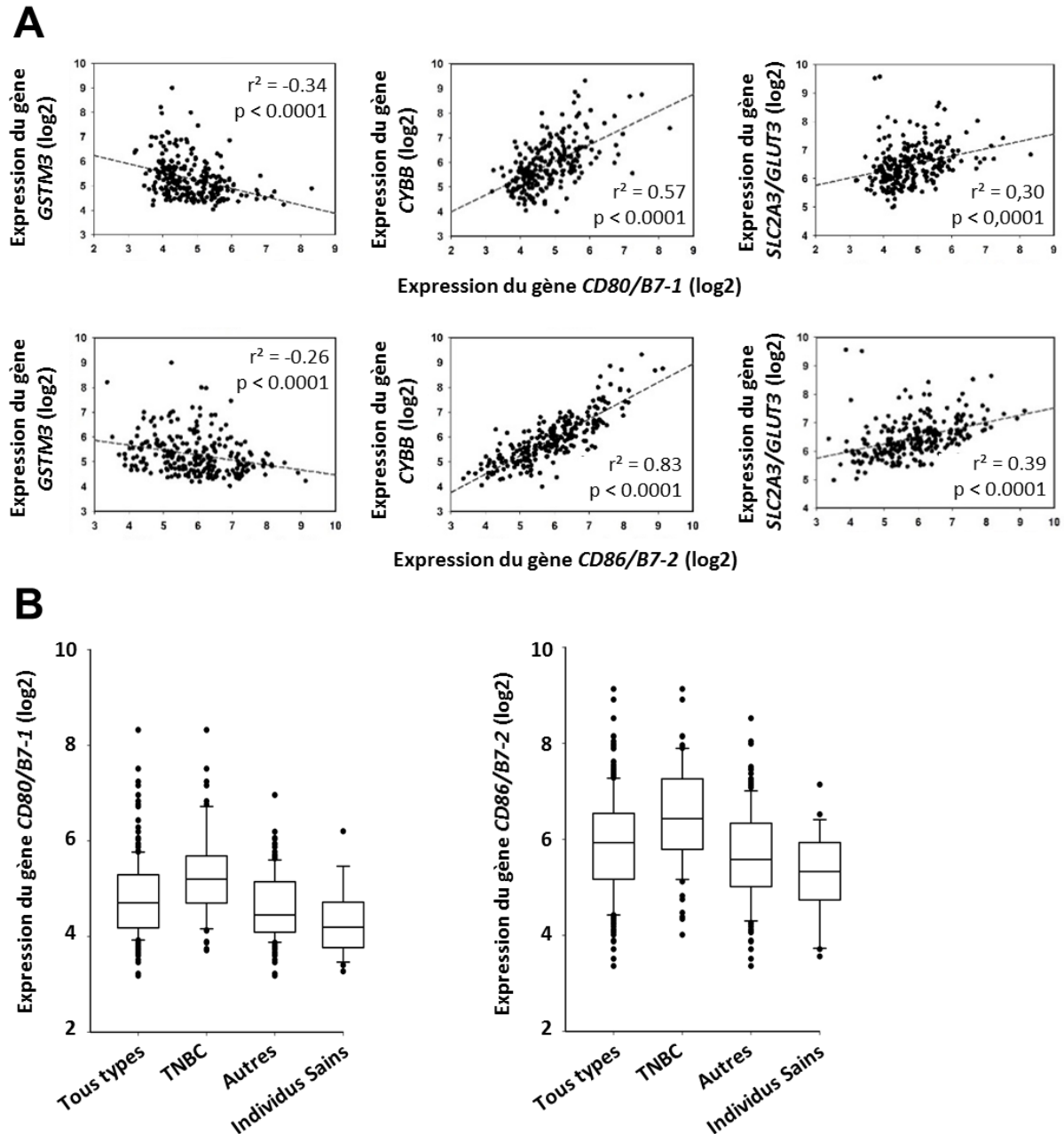


Figure 55: Profil d'expression des molécules CD80/B7-1 et CD86/B7-2 dans les cancers du sein et corrélation avec l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme. (A) Corrélation entre l'expression des gènes *GSTM3*, *CYBB* ou *SLC2A3/GLUT3* et *CD80/B7-1* ou *CD86/B7-2*. Analyse faite à partir de tous les types tumoraux de la base de données GSE21653. Les corrélations sont évaluées par le coefficient de Pearson (r^2) et la p -valeur (p), présentés sur les nuages de points. (B) Boxplot représentant les différences d'expression des gènes *CD80/B7-1* et *CD86/B7-2* (valeurs en log₂) entre tous les sous-types de cancers du sein ($n = 242$), les TNBC ($n = 75$), les autres sous-types ($n = 169$) et les patients sains ($n = 24$) dans la base de données GSE21653.

CONCLUSION PARTIE III. Modulation du métabolisme suite à l'expression de PD-L1

La voie NRF2 étant connue pour moduler le métabolisme cellulaire, nous nous sommes intéressés à la respiration mitochondriale et aux fonctions glycolytiques de ces cellules.

Ainsi, nous avons démontré que l'expression de l'isoforme 1 de PD-L1 engendre une diminution de la phosphorylation oxydative des cellules MDA-MB-231, associée à une augmentation de leurs capacités glycolytiques. Ces données ont été confirmées par dosage du taux de consommation de glucose par ces cellules, de la production de lactate et par une analyse métabolomique. Celle-ci a mis en évidence une élévation des taux de métabolites glycolytiques dans la lignée « PD-L1 » par rapport à la « VIDE ». De même, une tendance à l'augmentation de la production de nucléosides, nucléotides et acides aminés a été observée dans les cellules exprimant PD-L1.

Des données préliminaires suggèrent une stabilisation plus importante de la protéine HIF-1 α dans la lignée « PD-L1 » pouvant expliquer cette élévation de la glycolyse, ce facteur y étant couramment associé. Nous avons également observé une augmentation *in vivo* de ses gènes cibles *SLC2A1/GLUT1*, *SLC2A3/GLUT3*, tous deux transporteurs de glucose, ainsi que du gène codant l'enzyme glycolytique PDHK1. Toutefois, davantage d'expériences sont nécessaires pour déterminer en détail le rôle que joue HIF-1 α dans notre modèle cellulaire de cancer du sein.

Dans un second temps, nous avons voulu évaluer le rôle de PD-L1 dans le métabolisme des autres modèles cellulaires de cancer solide générés : A375 (mélanome) et MCF7 (cancer du sein), surexprimant ou non l'isoforme 1 de PD-L1. Cette surexpression n'y engendre pas de modulation du métabolisme glycolytique alors qu'à l'inverse des cellules MDA-MB-231, la phosphorylation oxydative y est retrouvée augmentée.

Enfin, nous avons mis en évidence *in silico* à partir de bases de données de patients atteints de cancer du sein, des corrélations d'expression d'ARNm entre *CD274/PD-L1* et des gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire et la réponse au stress oxydatif. En élargissant cette étude à d'autres membres de la famille B7, tels que *CD80/B7-1*, *CD86/B7-2* et *PD-L2*, nous avons mis en évidence certaines similitudes entre ces corrélations de gènes au sein de cette famille. Ces résultats suggèrent donc un effet de classe plutôt qu'un effet dû uniquement à la protéine PD-L1 ; il serait donc intéressant d'explorer cet axe de recherche plus en détail.

**DISCUSSION
ET
PERSPECTIVES**

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les cancers du sein ont d'abord été considérés comme des tumeurs non-immunogènes, c'est-à-dire ayant une faible capacité à activer le système immunitaire en raison des faibles taux d'expression d'antigènes anormaux à leur surface. Ces cancers seraient donc à même d'échapper à la surveillance du système immunitaire. Cependant, de récentes études ont démontré que l'expression de gènes de l'immunité et la présence d'infiltrats de cellules immunitaires dans les tumeurs primaires de sein sont associées à une meilleure évolution clinique, particulièrement dans les sous-types les plus agressifs (HER2-positif et triple négatif (TNBC)) ^{254,258}. Les patients atteints d'un cancer du sein triple négatif répondent initialement à une chimiothérapie conventionnelle, mais la maladie récidive fréquemment, avec un pronostic plus mauvais que pour les patients présentant d'autres sous-types de cancer du sein ^{254,258}.

Le récent succès des inhibiteurs d'*immune checkpoints* dans de multiples affections malignes solides et hématologiques, ainsi que le nombre croissant d'études démontrant un rôle pronostique et prédictif du système immunitaire dans le cas du cancer du sein, ont encouragé le développement de nouvelles stratégies immuno-thérapeutiques. Certaines de ces thérapies, dont l'objectif est de rétablir et de stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale, font actuellement l'objet d'essais cliniques dans le cas du cancer du sein ^{254,258}. Cependant, des études publiées dernièrement ont mis en évidence que ces *immune checkpoints*, dont l'axe PD-1/PD-L1, peuvent également avoir des fonctions intrinsèques, non immunologiques, responsables de la progression tumorale (**Introduction, Partie 1, chapitre 4.4.**) ¹⁷².

De ce fait, l'objectif de ce travail doctoral était de déterminer les fonctions intrinsèques et les voies de signalisation modulées par la protéine PD-L1 dans le cancer du sein, et notamment dans la lignée cellulaire triple-négative MDA-MB-231. Pour se faire, en utilisant une méthode d'édition du génome, nous avons invalidé le gène *CD274* codant la protéine PD-L1 dans les cellules cancéreuses de sein MDA-MB-231 et avons pu investiguer son impact aux niveaux phénotypique, transcriptionnel et fonctionnel après surexpression ou non dans ces mêmes cellules *KO*.

1. PD-L1, une glycoprotéine pas seulement membranaire

La protéine PD-L1, décrite comme molécule de surface, est également exprimée dans le cytoplasme et le noyau (**Figures 33 et 35, p.162 et 165**).

Quel impact les diverses localisations de PD-L1 pourraient-elles avoir sur ses fonctions ?

Jusqu'à récemment, les protéines de la famille B7 étaient considérées comme molécules de surface et ligands de récepteurs présents sur les cellules lymphoïdes¹⁷⁰. En 2008, une localisation cytoplasmique et nucléaire de PD-L1 a été mise en évidence dans la lignée de cancer du sein MDA-MB-231²³⁶. Peu de temps après, une localisation sub-cellulaire de B7-H4, autre molécule de la famille B7 a été démontrée²¹⁸. A partir de notre modèle cellulaire de cancer du sein MDA-MB-231, il nous a donc semblé intéressant d'analyser la localisation intracellulaire de PD-L1 par immunofluorescence (**Figure 33, p.162**). Nos résultats mettent en évidence une localisation membranaire, cytoplasmique et nucléaire de cette protéine, surexprimée dans les cellules MDA-MB-231 « PD-L1 », Ceci est en accord avec les données de Ghebeh *et al.* sur la localisation de PD-L1 endogène dans cette lignée cellulaire²³⁶, et suggère donc la présence d'un signal de localisation nucléaire NLS (*Nuclear Localization Sequence*). Les NLS correspondent généralement à des séquences courtes, composées d'acides aminés chargés positivement [Lysine (K), Arginine (R)]. Selon l'analyse réalisée à l'aide d'un logiciel de prédiction de domaine NLS, *NucPred*, PD-L1 posséderait un NLS potentiel au niveau de sa région cytoplasmique C-terminale : RLRKGRMMDVKKCG. Ceci confirme notre prévision : RLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQ entre les acides aminés 260 et 290. De plus, une séquence d'export nucléaire LGAILLC LGVALTF serait potentiellement présente au niveau de la région trans-membranaire de la protéine, avec une probabilité de 55% selon le logiciel de prédiction NetNES v1.1 (*DTU Bioinformatics*)⁵⁷⁵. D'autre part, pour les autres lignées cellulaires de surexpression de PD-L1 générées : MCF7, A375 et K562, une forte expression intracellulaire a été observée (**Figure 35, p.165**), contrairement à la forme membranaire très faiblement exprimée voire absente.

Ces résultats sont d'autant plus intéressants que si les molécules B7 ont longtemps été décrites comme ligands de récepteurs lymphocytaires^{148,170}, leur expression intracellulaire n'a été associée à des rôles non-immunologiques que très récemment^{218,236}. Par exemple, la protéine B7-H4 est impliquée dans la prolifération tumorale et possède une fonction anti-apoptotique, ces deux fonctions étant dépendantes d'une localisation nucléaire. B7-H4 possède en effet un domaine NLS entre les résidus 241 et 282 (KRRSH), lui permettant de faire la navette entre le cytoplasme et le noyau²¹⁸. Par ailleurs, il a été suggéré qu'une localisation nucléaire de la protéine PD-L1 peut être associée à la résistance

des cellules tumorales aux anthracyclines dans les néoplasies mammaires^{235,236}. Toutefois, aucune interaction entre PD-L1 et un facteur nucléaire n'ayant été mise en évidence jusqu'à présent, les fonctions de cette localisation restent à déterminer.

L'étude de la localisation sub-cellulaire de PD-L1 pourrait-elle présenter un intérêt thérapeutique ?

Le succès récent des stratégies thérapeutiques ciblant l'interaction PD-1/PD-L1 afin de rétablir une réponse immunitaire anti-tumorale effective, notamment par utilisation d'anticorps bloquants²⁶¹, amène les chercheurs à évaluer la pertinence pronostique de l'expression de PD-L1 dans une multitude de types tumoraux. Si un grand nombre d'études ont mis en évidence une corrélation positive entre l'expression aberrante de PD-L1 et un mauvais pronostic dans divers types de cancers^{120,155}, peu se sont intéressées à distinguer l'impact clinique des différentes localisations sub-cellulaires. Par exemple, dans le cas de cellules tumorales métastatiques circulantes (CTC) provenant de patients atteints de cancer du sein à récepteurs hormonaux positifs, Mazel *et al.* ont récemment démontré une expression fréquente de PD-L1 à leur surface, sans déterminer son taux d'expression dans chaque compartiment cellulaire⁵⁷⁶. Cela semble pourtant essentiel, si l'on se réfère à une étude publiée en 2016 stipulant que seule la localisation nucléaire de PD-L1 serait un facteur de mauvais pronostic associé à une diminution de la survie globale ou de la survie sans progression, chez les patients respectivement atteints de cancer colorectal ou de cancer de la prostate⁵⁷⁷. La localisation nucléaire de PD-L1 dans les CTC pourrait donc être un marqueur pronostique utile pour différents types de cancers. Cependant, il serait nécessaire de confirmer ces résultats dans des études prospectives multicentriques.

Qu'en est-il des autres membres de la famille B7 ?

Etonnamment, peu d'études se sont intéressées à ce sujet. Toutefois, concernant la protéine B7-H3, les premières données suggèrent que sa localisation impacte ses fonctions. En effet, une expression de B7-H3 est corrélée à un mauvais pronostic et un stade tumoral avancé dans divers types de cancers¹⁷². Toutefois, dans le cancer du colon, seule la localisation nucléaire de B7-H3 serait associée à la présence de métastases et à une survie globale diminuée, indépendamment des formes cytoplasmique et membranaire¹⁸⁰. D'autre part, l'expression de la protéine B7-H4 a été détectée au niveau de la membrane, du cytoplasme et du noyau des cellules de carcinome rénal (RCC), les formes nucléaire et membranaire étant corrélées avec les différents stades tumoraux²¹⁸.

Ainsi, il serait intéressant et nécessaire d'approfondir nos connaissances quant aux fonctions spécifiques des localisations membranaire, cytoplasmique et nucléaire de cette famille de molécules. Cela pourrait permettre de développer de nouveaux biomarqueurs pronostiques

et prédictifs de la réponse aux immunothérapies nouvellement développées, comme celles ciblant les molécules B7 et notamment PD-L1. Il serait donc pertinent que les études distinguent l'impact que joue chaque localisation cellulaire indépendamment des autres lors de l'évaluation de la valeur pronostique des membres B7. A terme, cela pourrait nous amener à repenser la stratégie d'utilisation des thérapies actuelles, ciblant ces molécules à la surface des cellules tumorales, notamment les anticorps anti-PD-L1. En effet, selon la localisation sub-cellulaire de cette protéine et les fonctions associées, des thérapies complémentaires pourraient être administrées au patient.

Quels sont les rôles possibles de la N-glycosylation de PD-L1 que nous avons mise en évidence ?

Lors de l'étude de l'expression globale de la protéine PD-L1 par Western-blot (**Figure 33, p.162**), l'anticorps spécifique de cette protéine a mis en évidence une forme d'environ 55 kDa. La molécule PD-L1 dont la taille théorique est de 33 kDa, possède au niveau de sa partie extra-membranaire des sites de N-glycosylation potentiels au niveau des acides aminés 35 (domaine IgV), 200 et 219 (domaine IgC₂), ainsi qu'un résidu connu pour être glycosylé, l'acide aminé 192 (domaine IgC₂) (**Figure 4, p.43**)¹⁸². Nous avons donc voulu déterminer si cette différence entre tailles théorique et observée était due à une N-glycosylation de PD-L1. Afin de tester cette hypothèse, nous avons traité les cellules MDA-MB-231 avec un inhibiteur de N-glycosylation, la tunicamycine. Après traitement, nous avons observé une diminution de la bande de 55 kDa, corrélée à l'apparition d'une bande d'environ 35 kDa. Nos résultats démontrent donc qu'en condition basale de culture, seule une forme N-glycosylée de la protéine PD-L1 est exprimée dans les cellules de cancer de sein MDA-MB-231. Ces données ont également été confirmées à partir de lysats totaux des cellules MCF7, A375 et K562 (**Figure 34, p.164**). D'autre part, il est intéressant de noter que l'isoforme 2 de la protéine PD-L1 dont la taille théorique est de 20,2 kDa, est détectée par Western-blot à une taille d'environ 50 kDa (données non montrées). Cela suggère une forme également N-glycosylée de cette seconde isoforme, qui possède tout comme l'isoforme 1, les trois résidus glycosylables au niveau de son domaine IgC₂.

Cette modification post-traductionnelle est connue pour maintenir l'intégrité des protéines mais aussi réguler divers processus comme leur repliement correct, leur trafic intracellulaire et les interactions protéine-protéine⁵⁷⁸. En 2016, il a été rapporté que la N-glycosylation de PD-L1 régule le phénomène d'immuno-suppression^{579,580}, en empêchant la glyco-gène synthase kinase 3 β (GSK3 β) de phosphoryler PD-L1 et donc de favoriser sa dégradation. De ce fait, la protéine PD-L1 est stabilisée et peut exercer son rôle d'immuno-régulation en supprimant l'activité des cellules T cytotoxiques⁵⁸⁰. Une étude plus approfondie a par ailleurs mis en évidence l'importance de la forme N-glycosylée de PD-L1

dans l'interaction avec son récepteur lymphocytaire PD-1 dans le cas du cancer du sein triple négatif ⁵⁸¹. En effet, dans les cellules cancéreuses de sein TNBC, l'EGF engendre la surexpression de l'enzyme β -1,3-N-acétylglucosaminyltransférase 3 (B3GNT3) dont l'activité est responsable de la N-glycosylation de PD-L1, favorisant sa liaison avec PD-1 ⁵⁸¹. Ainsi, l'immunité anti-tumorale des lymphocytes T dépendrait de formes glycosylées des molécules co-inhibitrices exprimées à la surface des cellules cancéreuses.

De plus, il est intéressant de noter que cette glycosylation fonctionnelle a jusqu'à présent été décrite au niveau des membres co-inhibiteurs et non des membres co-stimulateurs de la famille B7 ⁵⁸². La glycosylation serait donc impliquée dans les interactions de signalisation co-inhibitrices.

Cette modification post-traductionnelle pourrait-elle influencer l'efficacité des immunothérapies ciblant l'axe PD-1/PD-L1 utilisées en clinique ?

Dans un grand nombre de cancers, la protéine PD-L1 est fortement exprimée à la surface des cellules malignes et de certaines cellules immunitaires de l'infiltrat tumoral, telles que les macrophages et les cellules dendritiques. L'expression de PD-L1 est en effet induite par des cytokines du micro-environnement tumoral, comme l'IFN- γ et le TNF- α ¹⁵⁵. Toutefois, comme cela a été mis en évidence dans le cas du cancer du poumon non à petites cellules, son expression à la surface des cellules malignes serait en réalité hétérogène ⁵⁸³. Toutes les cellules cancéreuses n'expriment pas PD-L1 au sein d'une même tumeur, cela pourrait expliquer certaines limites quant à l'efficacité des immunothérapies ciblant cette protéine. Aussi, quelle stratégie thérapeutique serait-il possible d'envisager afin de cibler toutes les cellules tumorales ? Le ciblage de la forme N-glycosylée de PD-L1 améliorerait-il l'efficacité de ces traitements ?

Les cellules cancéreuses de sein triple négatives expriment PD-L1 sous forme N-glycosylée, du fait de l'activité de la glycosyltransférase B3GNT3 ⁵⁸¹. Celle-ci n'étant que très faiblement exprimée dans les tissus mammaires normaux, cela laisse penser que le phénomène de glycosylation observé pour la protéine PD-L1 pourrait être associé au phénotype tumoral.

Ainsi, après avoir généré un anticorps monoclonal spécifique des résidus glycosylés N192/N200 de PD-L1 (gPD-L1), Li et *al.* ont montré que son utilisation réactive l'immunité anti-tumorale en supprimant l'interaction PD-1/PD-L1, et provoque également l'internalisation et la dégradation de la molécule PD-L1 ⁵⁸¹. De plus, la conjugaison de cet anticorps gPD-L1 avec un médicament (*monomethyl auristatin E*, inhibiteur de la mitose ⁵⁸⁴), augmente son efficacité anti-tumorale en engendrant la destruction des cellules cibles et des cellules cancéreuses adjacentes pourtant dépourvues d'expression de PD-L1 ⁵⁸¹. Cela suggère que le ciblage de la N-glycosylation de ces protéines pourrait être considéré comme une stratégie potentielle et prometteuse pour améliorer l'efficacité des immunothérapies.

Par ailleurs, il semblerait que ces observations puissent être élargies à d'autres membres B7, comme B7-H3, qui possède huit résidus asparagine N-glycosylables en positions 91, 104, 189, 215, 309, 322, 407 et 433¹⁷⁹. De manière intéressante, il a été montré que les structures glycaniques de B7-H3 exprimée à la surface des cellules normales et des cellules de cancer de la cavité buccale sont différentes¹⁷⁹. En effet, en plus de présenter des taux de fucosylation augmentés de la molécule B7-H3 par rapport à leurs homologues normales, les cellules malignes possèdent un α -galactose au niveau de la terminaison des chaînes glycanes de cette protéine. Cela leur confère une meilleure capacité d'interaction avec les récepteurs Langerin/CD207 et DC-SIGN (*DC-specific intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin*), exprimés à la surface des cellules dendritiques¹⁷⁹.

Ainsi, ces données suggèrent que les glycanes portés par ces protéines d'immuno-évasion jouent un rôle essentiel dans l'interaction des cellules tumorales avec celles de l'immunité. Une meilleure compréhension de ces phénomènes pourrait aider à mieux cibler les cellules cancéreuses et dans le cas présent, à améliorer l'efficacité des immunothérapies ciblant ces *immune checkpoints*.

2. Croissance cellulaire et tumorigénicité induites par PD-L1 : comparaison avec les données bibliographiques

Lors de la caractérisation phénotypique des lignées de cancer du sein MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 » générées, nous avons montré que l'expression de l'isoforme 1 de cette protéine engendre une modeste – mais significative – réduction de la croissance des cellules *in vitro*, due à l'élévation du taux basal de mortalité (**Figures 36 et 37, p.168 et 169**). A l'inverse, la croissance tumorale est augmentée par PD-L1 après xénotransplantation dans des souris *Nude* (**Figure 38, p.170**). Ces résultats suggèrent un rôle important du micro-environnement dans ce développement tumoral dépendant de PD-L1.

Tout d'abord, nos données sont-elles en accord avec la bibliographie ?

L'augmentation de tumorigénicité liée à l'expression de PD-L1 dans des souris *Nude* rejoint les observations faites par d'autres équipes^{585,586}. En revanche, l'impact négatif de PD-L1 au niveau de la croissance des cellules MDA-MB-231 contraste avec les données publiées, PD-L1 y étant décrite comme favorisant la croissance *in vitro*^{225,585,587}. Par exemple, des cellules de myélome multiple exprimant fortement cette protéine présentent une prolifération accentuée ainsi qu'une sensibilité diminuée aux thérapies dexaméthasone et melphalan (Alkeran®)⁵⁸⁷. Similairement, les cellules murines⁵⁸⁷ de mélanome B16 ou de cancer de l'ovaire ID8 dont l'expression de PD-L1 a été inhibée par l'utilisation de siRNA

présentent des croissances cellulaire et tumorale diminuées par rapport aux cellules contrôle⁵⁸⁵. D'autre part, il a été montré que le taux d'expression du marqueur de prolifération Ki67 est plus élevé dans des cellules souches de cancer gastrique exprimant fortement PD-L1 que dans les cellules PD-L1-négatives²²⁵. Ainsi, l'expression de PD-L1 est couramment associée à une élévation de la croissance cellulaire *in vitro*, ce qui est donc en contradiction avec les données obtenues lors de ce travail.

Toutefois, les études publiées sur le sujet ne sont pas toutes concordantes, suggérant des fonctions de PD-L1 pouvant dépendre du modèle d'étude, du type de cancer ou du micro-environnement tumoral. A titre d'exemple, si l'expression de PD-L1 à la surface de cellules de cholangiocarcinome régule négativement le phénotype de cellules souches²²⁴, elle serait à l'inverse associée au maintien de la sous-population souche suite à l'activation de la voie PI3K/AKT dans des cellules de cancer du sein²²⁶.

Comment pouvons-nous expliquer la différence entre nos résultats de croissance *in vitro* et la majorité de ceux de la bibliographie ?

Nous pouvons émettre l'hypothèse que les différences de croissance cellulaire observées entre notre modèle d'étude MDA-MB-231 et les données de la bibliographie sont dues au type tumoral ou au contexte cellulaire. En effet, si on prend l'exemple de B7-H3, une autre molécule de la famille B7, il a été montré que son expression favorise la croissance tumorale dans le cas du carcinome de la cavité buccale¹⁷⁹ et des leucémies myélo-monocytaires aiguës²¹⁵. En revanche, dans le cancer du sein, B7-H3 est associée à une réduction de la croissance des tumeurs liée à une régulation négative de l'expression de VEGF²²³. Ces différentes études laissent donc penser que les fonctions de B7-H3 sont dépendantes du contexte cellulaire. De la même manière, si dans le cancer du poumon la protéine B7-H4 soutient la progression tumorale en induisant notamment l'activation de la voie AKT, ce même effet mettrait en jeu les voies IL-6/STAT3 et ERK1/2 dans les cas de mélanome, de carcinome oesophagien et de cancer du pancréas^{221,222}. Les voies impliquées dans les processus intrinsèques du développement tumoral et modulées par les membres B7 dépendraient donc du type de cancer.

Une autre explication pourrait venir des modèles cellulaires d'étude eux-mêmes, les méthodes utilisées pour diminuer ou invalider l'expression des gènes codant les protéines B7 étant différentes. En effet, la majorité des études utilise des ARN interférents (ARNi) qui réduisent l'expression des gènes cibles sans toutefois les invalider^{224,226,585}, alors que notre travail a été réalisé à partir d'un modèle cellulaire où le gène *CD274* a été invalidé par la technologie des *Zinc Finger Nucleases*. Aussi, les différents taux d'expression de PD-L1 résultant de l'utilisation de deux stratégies distinctes, pourraient avoir impacté les résultats subséquents obtenus et être à l'origine des discordances observées.

Nous pouvons également nous questionner à propos du rôle de chacune des isoformes protéiques de PD-L1. Effectivement, les études s'intéressant aux fonctions de PD-L1 et qui utilisent des ARNi, connus pour cibler la région codant le domaine IgC₂ commun aux trois isoformes protéiques de PD-L1 (**Figure 4, p.43**), ne font donc pas la distinction entre ces différentes isoformes. Il est par conséquent impossible d'être certains que les effets observés et décrits par les auteurs résultent uniquement des fonctions de l'isoforme 1 de PD-L1, que nous étudions dans cette étude, aucune caractérisation de l'expression des isoformes 2 et 3 n'ayant été réalisée à ce jour et leurs fonctions n'étant que peu étudiées.

L'isoforme 2, également transmembranaire mais aussi localisée au niveau des membranes intracellulaires, régule négativement l'expression de surface de l'isoforme 1^{119,184,185}. Cela est d'autant plus intéressant que nous avons détecté une expression faible voire nulle de l'isoforme 1 de PD-L1 à la surface de nos modèles cellulaires MCF7, A375 et K562 par cytométrie en flux (données non montrées), alors qu'une forte expression intracellulaire a été observée dans ces cellules par microscopie confocale (**Figure 35, p.165**). Nous ne pouvons donc exclure une possible expression et fonction de l'isoforme 2 dans ces lignées ainsi que dans celles utilisées dans les études citées plus haut^{224,226,585}.

L'isoforme 3 étant sécrétée par les cellules cancéreuses suite au clivage de l'isoforme 1 par des métalloprotéinases¹⁸⁶, son éventuelle expression dans notre modèle et ceux de la littérature exprimant l'isoforme protéique 1 ne peut être écartée. Nous avons étudié spécifiquement la fonctionnalité de l'isoforme majeure de PD-L1, l'isoforme 1, au niveau de la croissance des cellules de cancer du sein MDA-MB-231, invalidées au préalable pour le gène codant cette protéine. Il nous est donc difficile de comparer notre étude avec les données publiées utilisant des lignées pouvant exprimer toutes les isoformes.

Quelles seraient les expériences à envisager afin de tester la véracité de ces hypothèses ?

Les modèles cellulaires de surexpression de l'isoforme 1 de PD-L1, MCF7, A375 et K562 sont actuellement en cours d'étude au laboratoire. Leur gène *CD274* n'ayant pas été invalidé par technique d'édition du génome, le contexte cellulaire est comparable à celui des modèles utilisés dans la bibliographie. Ainsi, une analyse de la croissance cellulaire réalisée à partir de ces lignées pourrait être envisagée dans l'objectif de comparer les résultats avec ceux de la bibliographie. À l'inverse, nous pourrions utiliser des ARN interférents ciblant l'ARNm *PD-L1* dans des cellules exprimant fortement la protéine PD-L1 endogène, afin d'analyser de la même manière ses fonctions intrinsèques.

Notre modèle MDA-MB-231 ± PD-L1 a l'avantage de nous permettre d'étudier spécifiquement la fonctionnalité de l'isoforme 1 de cette protéine. Dans le but d'effectuer une comparaison des rôles des isoformes 1 et 2 de PD-L1, une lignée MDA-MB-231 *CD274-KO*

surexprimant uniquement l'isoforme 2 est en cours de génération. Il serait également intéressant d'évaluer le taux d'expression des différentes isoformes dans les modèles MCF7, A375 et K562. En effet, si seule l'isoforme 1 était détectée, nous serions assurés d'étudier exclusivement ses fonctions. L'isoforme 3 étant une forme sécrétée, son expression peut être analysée par test ELISA, réalisé sur le surnageant du milieu de culture. L'expression de cette isoforme pourrait également être évaluée dans nos lignées MDA-MB-231 ± PD-L1. Les isoformes 1 et 2 se différencient exclusivement par l'absence de domaine IgV dans la seconde ; leur détection par anticorps ne permettrait donc pas de les discriminer. Il faudrait alors analyser l'expression de leurs transcrits en utilisant des amorces spécifiques pour chacune des isoformes, comme cela a été fait par Brodska *et al.*, sachant que l'isoforme 2 issue d'épissage alternatif ne possède pas l'exon 2 ¹⁸⁵.

3. La reprogrammation métabolique *in vivo* induite par PD-L1 prédomine-t-elle sur la diminution de croissance *in vitro* ?

Si l'on se focalise sur les résultats obtenus à partir de notre modèle d'étude généré dans la lignée MDA-MB-231, comment expliquer à la fois la diminution de la croissance cellulaire *in vitro* et la plus forte tumorigénicité *in vivo*, induites par PD-L1 ? Outre son faible mais significatif impact sur la croissance cellulaire, la protéine PD-L1 régule négativement la voie de réponse au stress oxydatif NRF2 (**Figure 44, p.180**), en accord avec l'augmentation des niveaux de ROS intracellulaires observée dans la lignée « PD-L1 » par rapport aux cellules « VIDE » (**Figure 45, p.183**). Cette voie étant connue pour moduler le métabolisme cellulaire, nous avons ensuite analysé la respiration mitochondriale ainsi que les fonctions glycolytiques de ces cellules, et avons démontré que l'expression de l'isoforme 1 de PD-L1 engendre un *shift* de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse (**Figures 46 et 47, p.186 et 188**). Ce phénomène, aussi appelé « effet Warburg », est souvent associé à une agressivité tumorale accrue ²⁶⁴. De ce fait, parmi les différentes fonctions intrinsèques de PD-L1 observées *in vitro*, dont le modeste désavantage de croissance, le *shift* métabolique ne pourrait-il pas prévaloir *in vivo* et favoriser la tumorigénicité ?

Bien que la plus forte tumorigénicité des cellules cancéreuses exprimant PD-L1 soit connue depuis plus d'une décennie, cet effet est considéré comme principalement lié aux effets inhibiteurs de PD-L1 sur l'activité des lymphocytes T ^{61,120,155,157,193,203,209}. Dans notre étude, les expériences de xéno greffe ont été réalisées chez des souris *Nude* (**Figure 38, p.170**), caractérisées par une absence de lymphocytes T. De ce fait, la croissance tumorale accentuée par l'expression de PD-L1 ne peut être due à l'effet immuno-suppresseur de cette protéine sur ces cellules. Toutefois, PD-L1 a été décrite comme réduisant l'activité des

lymphocytes B, des NK et des cellules dendritiques (**Introduction, Partie 1, chapitre 4.3.3.2.3**)¹⁹³. Nous pouvons donc nous demander si l'interaction avec le récepteur PD-1 exprimé à la surface de ces cellules immunes ne provoquerait pas leur inactivation. Cela pourrait être un premier élément de réponse à la croissance augmentée des tumeurs « PD-L1 » par rapport aux « VIDE », *in vivo* chez les souris *Nude*.

Qu'en est-il des fonctionnalités intrinsèques de PD-L1 et de la compétition métabolique au sein du micro-environnement tumoral ?

Curieusement, en dehors de son rôle immuno-suppresseur, le rôle de l'activité intrinsèque de la protéine PD-L1 dans la progression tumorale n'est que peu décrit. Dans un modèle de sarcome, il a été démontré que les cellules tumorales et les lymphocytes T sont en compétition pour la captation de glucose dans le micro-environnement ; les inhibiteurs thérapeutiques ciblant l'axe PD-1/PD-L1 corrigent ce déséquilibre métabolique en affectant directement les cellules tumorales et en rétablissant la fonctionnalité des cellules T²¹¹. En outre, PD-L1 contribuerait à la croissance tumorale en supprimant l'activité des lymphocytes T suite à son interaction avec PD-1, ainsi qu'en engendrant une reprogrammation métabolique caractérisée par une consommation accrue de glucose qui stimule de manière directe le développement de la tumeur²¹¹.

Une compétition métabolique entre les cellules peut moduler leur croissance, leur survie et leurs fonctions. Cette compétition existe entre les cellules du micro-environnement tumoral, notamment entre cellules cancéreuses et immunitaires. Aussi, dans notre modèle d'étude, une compétition métabolique ne pourrait-elle pas exister *in vivo*, chez les souris *Nude*, entre les cellules malignes PD-L1⁺ et les cellules immunitaires autres que les lymphocytes T ? En effet, les voies métaboliques sont essentielles au bon fonctionnement des cellules de l'immunité. Par exemple, une corrélation positive entre les compétences glycolytiques et les capacités de phagocytose des cellules leucémiques a été mise en évidence dans le cas des monocytes. Ces capacités sont diminuées après activation de l'axe PD-1/PD-L1²¹³. Cela suggère donc un rôle majeur du phénomène de compétition métabolique, et notamment du métabolisme du glucose, dans la régulation de l'activité des cellules immunitaires. Cela est d'autant plus intéressant car nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression des transporteurs du glucose *GLUT1* et *GLUT3* ainsi que de l'enzyme glycolytique *PDHK1* dans les tumeurs « PD-L1 » par rapport aux « VIDE » (**Figure 51, p.194**). Ces données, en accord avec celles de la bibliographie²¹¹, suggèrent une élévation de l'activité glycolytique des tumeurs PD-L1⁺ et reflètent le rôle de cette protéine dans la consommation et l'utilisation de glucose lors du développement tumoral. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que des restrictions métaboliques imposées par la tumeur et associées à l'expression de PD-L1 sont

probablement à l'origine de dysfonctionnements des cellules de l'immunité et peuvent conduire à une progression tumorale exacerbée.

Par ailleurs, l'augmentation de la voie de la glycolyse pourrait être un effet de classe des molécules B7, ce phénomène ayant également été observé pour B7-H3 dans le cas de cellules cancéreuses de sein et de mélanome^{230,248}. En effet, Lim *et al.* ont montré que la répression de la voie NRF2 en réponse à une surexpression de B7-H3 engendre une élévation des niveaux de ROS, suivie de la stabilisation de la protéine HIF-1 α et de l'expression de certaines de ses cibles directes, impliquées dans le métabolisme glycolytique *in vivo*²⁴⁸. Similairement à B7-H3, et outre la diminution de l'activité du facteur NRF2 observée (**Figure 45, p.183**), nos données préliminaires suggèrent aussi la stabilisation de HIF-1 α lorsque PD-L1 est exprimée (**Figure 50, p.193**). Par conséquent, l'agressivité des tumeurs exprimant PD-L1 ne dépendrait pas exclusivement des effets immuno-suppresseurs de cette protéine, et serait possiblement associée à la modulation des voies NRF2 et de la glycolyse. La prédominance entre les effets intrinsèques ou extrinsèques de la protéine PD-L1 dépendrait alors du contexte tumoral, et notamment de la présence de cellules immunitaires infiltrées au niveau de la région maligne.

Comment distinguer expérimentalement si l'augmentation de la croissance tumorale est liée au rôle immunologique de PD-L1 ou à l'une de ses fonctions intrinsèques ?

Pour aller plus loin, il faudrait déterminer l'impact réel des fonctions métaboliques intrinsèques de ces protéines B7 et plus particulièrement de PD-L1, et pouvoir les distinguer du rôle immunologique. Pour cela, il serait intéressant de réitérer les expériences de xénogreffe réalisées précédemment (**Figure 38, p.170**) sur des souris davantage immunodéficientes que les *Nude*, telles que des *NSG (NOD scid gamma)*, caractérisées par l'absence de lymphocytes T, de lymphocytes B, de cellules dendritiques, de macrophages et de NK⁵⁸⁸. Nous pourrions ainsi étudier spécifiquement les fonctions intrinsèques de PD-L1, son effet immuno-suppresseur ne pouvant se manifester chez cette souche de souris. Il serait également pertinent de réaliser ces expériences *in vivo* chez les souris *Nude*, en les traitant avec des anticorps monoclonaux ciblant l'interaction PD-1/PD-L1, afin de déterminer si la modulation de l'activation de cet axe inhibe ou amplifie les différences de croissance tumorale observées. Par ailleurs, la consommation de glucose par les cellules tumorales pourrait être quantifiée *in vivo* par imagerie après injection de 2-DéoxyGlucose fluorescent.

4. D'autres voies de signalisation sont-elles impliquées dans les fonctions métaboliques de PD-L1 observées ?

Nos données ont été principalement obtenues à partir du modèle cellulaire de cancer du sein MDA-MB-231 *CD274-knock out* et exprimant ou non l'isoforme 1 majeure de PD-L1 (**Figure 33, p.162**). Plus tardivement lors de ce projet, nous avons généré des lignées de surexpression de cette protéine : MCF7 (cancer du sein), A375 (mélanome) et K562 (leucémie myéloïde chronique), dans le but de confirmer les fonctions de PD-L1 dans différents modèles cellulaires (**Figure 34, p.164**). De la même manière, une lignée MDA-MB-231 exprimant uniquement l'isoforme 2 de PD-L1 est en cours de génération.

Différentes isoformes protéiques de PD-L1 pour différentes fonctions ?

Lors de l'étude du métabolisme de ces cellules de cancer du sein, nous avons montré que l'expression de l'isoforme 1 de PD-L1 engendre une diminution de leur phosphorylation oxydative (**Figure 46, p.186**), associée à une élévation de leur capacité glycolytique (**Figure 47, p.188**). Une fois la lignée exprimant uniquement l'isoforme 2 obtenue, ces mêmes expériences seraient à réaliser afin de déterminer les fonctions de cette dernière et pouvoir les comparer avec celles de l'isoforme 1. Cela pourrait être un axe de recherche à développer par la suite, seul un rôle de régulation négative de l'expression de surface de l'isoforme 1 ayant été décrit à ce jour pour l'isoforme 2 ¹⁸⁵.

Par ailleurs, nous avons montré que la surexpression de PD-L1 dans les lignées de tumeurs solides MCF7 et A375 ne module pas le métabolisme cellulaire de la même manière que dans notre modèle d'étude MDA-MB-231. En effet, la protéine PD-L1 ne modifie pas les capacités glycolytiques de ces cellules (**Figure 52, p.195**) alors qu'à l'inverse des MDA-MB-231 « PD-L1 », la phosphorylation oxydative y est augmentée (**Figure 53, p.196**). D'autre part, l'impact de PD-L1 sur la voie NRF2 de réponse au stress oxydant observé dans le cas des MDA-MB-231 n'est pas retrouvé pour les lignées MCF7, A375 et K562. En effet, seule une diminution de l'expression de GSTM3 a été mise en évidence pour les cellules MCF7 surexprimant PD-L1 (**Figure 44 p.180**).

Suite à ces résultats, plusieurs hypothèses et explications possibles s'offrent à nous. Pouvons-nous réellement comparer ces modèles entre-eux ? Les voies de signalisation impliquées dans ces fonctions sont-elles modèle-dépendant ? Ces deux premières questions font référence à des éléments déjà discutés. A savoir, la comparaison entre un modèle *KO* et des lignées de surexpression est-elle possible ? Sachant que les modèles de surexpression peuvent exprimer les différentes isoformes protéiques de PD-L1 dont les fonctions sont inconnues, et que la localisation cellulaire de PD-L1 n'est pas identique entre les différentes lignées, une stricte analyse du rôle de l'isoforme 1 semble difficile. Il faudrait donc pour cela

réaliser des expériences supplémentaires, comme celles proposées précédemment (**Discussion, p.208 et 209**).

Quel est le lien entre PD-L1, la modulation du métabolisme et la voie NRF2 ?

La voie NRF2 est connue pour avoir un rôle dans le métabolisme cellulaire et favoriser notamment la glycolyse, le cycle TCA, la voie des pentoses phosphates et de la biosynthèse des nucléotides^{387,544,547}. Ce mode de régulation n'explique pas nos résultats, la voie NRF2 étant réduite dans les cellules MDA-MB-231 « PD-L1 » alors que la voie de la glycolyse est accentuée (**Figures 44 et 47, p.180 et 188**). De même, une tendance à l'augmentation des taux de nucléotides et d'acides aminés a été retrouvée dans les cellules « PD-L1 » (**Figure 49, p.192**), laissant penser à une possible élévation de la voie PPP et donc de la voie NRF2, ce qui est l'inverse de nos observations. De ce fait, nous avons émis l'hypothèse que le lien entre l'augmentation de la glycolyse et la dérégulation de la voie NRF2 suite à l'expression de PD-L1 dans notre modèle serait dû à une production de ROS accrue suivie de la stabilisation de HIF-1 α , comme cela avait été démontré pour la protéine B7-H3²⁴⁸. Cependant, il nous faudrait confirmer ce lien potentiel par des expériences supplémentaires. Nous pourrions en effet reproduire les expériences d'étude de la phosphorylation oxydative et de la glycolyse après transfection au préalable des cellules MDA-MB-231 \pm PD-L1 avec des ARN interférents ciblant *NRF2*. Si l'inhibition de son expression abolissait les différences métaboliques mises en évidence entre les lignées « VIDE » et « PD-L1 », cela prouverait le rôle de la voie NRF2 dans ce modèle. Il semblerait alors pertinent de réaliser cette même expérience avec des ARNi ciblant *HIF-1 α* afin de déterminer son degré d'implication dans la glycolyse. Par ailleurs, étudier l'expression de ses gènes cibles connus comme jouant un rôle dans la voie de la glycolyse serait intéressant. Ces hypothèses reposent sur les résultats obtenus à partir de notre modèle d'étude MDA-MB-231. Toutefois, il semblerait que le rôle de l'isoforme 1 de PD-L1 au niveau du métabolisme soit plus complexe, des effets différents ayant été observés à partir de deux de nos lignées de surexpression de PD-L1, MCF7 et A375. Effectivement, aucune modulation de la glycolyse n'a été mise en évidence avec ces modèles, alors que la phosphorylation oxydative y a été retrouvée augmentée en cas de surexpression de PD-L1 (**Figures 52 et 53, p.195 et 196**). Le facteur NRF2 serait-il également impliqué dans la régulation du métabolisme de ces lignées ? D'autres voies de signalisation joueraient-elles un rôle ? Nous avons en effet observé une diminution de l'expression de GSTM3, cible de NRF2, dans la lignée MCF7 « PD-L1 », laissant penser à une modulation de cette voie, bien que modeste, aucune autre cible n'étant affectée. Nous n'observons pas de différence pour les cellules A375 et K562 (**Figure 44, p.180**). Une explication plausible pourrait provenir de nos résultats de l'analyse de kinome.

Les modifications du kinome et du transcriptome dues à PD-L1 sont-elles liées ? La protéine p53 aurait-elle un rôle ?

L'analyse des données du kinome pour les lignées cellulaires MDA-MB-231 ± PD-L1 a démontré entre autres une diminution du taux de phosphorylation de la sérine 6 de la protéine p53 lorsque PD-L1 est exprimée (**Figure 40, p.173**). Cette modification post-traductionnelle a été associée à l'activation de p53 en réponse à des dommages de l'ADN induits par des radiations ionisantes ou des ultra violets⁵⁶¹, mais le degré de son importance fonctionnelle reste indéterminé. Ces résultats du kinome sont d'autant plus intéressants que des variations de taux d'expression de certains gènes cibles de p53 ont été détectés (**Figure 43, p.176**), de même que des dérégulations de voies p53-dépendantes, dont celle de NRF2, au niveau du transcriptome (**Tableau 12, p.177 et 178**). De ce fait, dans notre modèle de MDA-MB-231, la protéine p53 serait-elle impliquée dans la modulation de la réponse anti-oxydante induite par NRF2 ? Il devient de plus en plus évident que ces deux facteurs ont des fonctions similaires, en accentuant en particulier les capacités des cellules à atténuer un stress oxydatif. De plus, des boucles d'auto-régulation positive et négative existent entre ces deux facteurs (**Introduction, Partie 3, chapitre 4.7.2.**) et suggèrent que la relation entre NRF2 et p53 dépendrait du contexte cellulaire et biologique.

Nous avons montré que l'expression de PD-L1 engendre une élévation des niveaux de ROS (**Figure 45, p.183**), souvent responsables de la génération de dommages à l'ADN et donc d'une activation de p53. Cependant, la diminution observée du taux de phosphorylation de la sérine 6 de p53 laisse penser à une réduction d'une partie de son activité lorsque PD-L1 est exprimée. L'analyse de l'expression de gènes cibles de p53 semble appuyer ces données, l'expression des 2/3 des transcrits étudiés étant réprimée (**Figure 43, p.176**). Néanmoins, comment pouvons-nous expliquer ces données ? Existe-t-il un évènement d'inter-régulation positive entre les facteurs p53 et NRF2 dans notre modèle de MDA-MB-231, associé à l'expression de PD-L1 ? Ce phénomène semble complexe et davantage d'études seraient nécessaires afin de déterminer la véracité de nos hypothèses. Nous pourrions par exemple analyser le taux de phosphorylation de p53-Ser6 après transfection des lignées MDA-MB-231 ± PD-L1 avec des ARN interférents ciblant *NRF2*. Il serait également possible de traiter les cellules avec des agents activateurs ou inhibiteurs de NRF2, puis d'analyser l'expression de certains gènes cibles de p53, afin de déterminer si le facteur NRF2 impacte son activité transcriptionnelle. A l'inverse, nous pourrions réaliser ces mêmes expériences mais après traitement des cellules avec des activateurs ou inhibiteurs de p53 afin d'étudier les fonctions de NRF2 résultantes. Des tests luciférase pourraient également être envisagés.

Le statut mutationnel de p53 impacte-t-il les fonctions métaboliques de PD-L1 ?

Dans les cancers, le gène suppresseur de tumeur *TP53* subit de fréquentes mutations qui confèrent des propriétés oncogéniques de gain de fonction aux protéines p53 mutantes ⁵⁸⁹. Celles-ci sont connues pour avoir un impact sur la biologie des cellules tumorales en modifiant significativement la transcription de gènes cibles ⁵⁹⁰. Récemment, une étude a montré que des mutations à gain de fonction de p53 pourraient avoir un rôle majeur dans l'activité du facteur de transcription NRF2 ; c'est par exemple le cas de la mutation R280K, présente dans les cellules MDA-MB-231 ⁵⁹¹. En effet, la protéine p53 mutée est spécifiquement recrutée au niveau des promoteurs des gènes du protéasome suite à son interaction avec NRF2, suggérant que le contrôle transcriptionnel du mutant p53 dépendrait de NRF2. L'interaction p53 / NRF2 n'est pas retrouvée avec la forme sauvage de p53 ⁵⁹¹. En outre, le statut mutationnel de p53 impacterait-il les modifications métaboliques mises en évidence lors de notre étude, dépendantes de NRF2 et PD-L1 ?

Cette question est d'autant plus justifiée que l'élévation de la glycolyse et la diminution de la phosphorylation oxydative, phénomènes observés dans notre modèle MDA-MB-231, n'ont pas été retrouvés dans le cas des lignées MCF7 et A375 qui expriment toutes deux une forme sauvage de p53. De plus, les mutations activatrices induisent de hauts niveaux de stabilisation de p53 et son accumulation, contrairement à la forme sauvage qui est rapidement dégradée ⁵⁹². Cela expliquerait l'absence de détection de p53 pour les cellules MCF7 et A375 par Western-blot, que PD-L1 soit surexprimée ou non (**Figure 42, p.175**). De ce fait, les différences de phosphorylation de p53-Ser6 dépendantes de l'expression de PD-L1 sont-elles également associées à la mutation activatrice de p53, telle la mutation R280K présente dans les MDA-MB-231 ? Cet état de phosphorylation de p53 régule-t-il l'activité de NRF2 et les fonctions glycolytiques de nos modèles cellulaires ?

Beaucoup de questions restent encore en suspens et davantage d'expériences seraient nécessaires pour pouvoir y répondre. Il serait par exemple intéressant de traiter les cellules MDA-MB-231 ± PD-L1 avec du Prima-1 (*Selleckchem*), agent qui se fixe et convertit les protéines p53 mutantes en protéines actives de type sauvage-like ⁵⁹³, puis d'analyser la phosphorylation de p53-Ser6, l'expression des gènes cibles de ce facteur ainsi que ceux de NRF2. Ainsi, nous pourrions déterminer le rôle éventuel de la mutation activatrice R280K dans les fonctions métaboliques de PD-L1 que nous avons mises en évidence. Nous pourrions utiliser le réactif Nutlin-3 (*Selleckchem*) en tant que contrôle de traitement, cet agent étant connu pour provoquer l'accumulation de p53 ; nous ne devrions pas observer de différence dans le modèle de MDA-MB-231, sachant que la protéine est déjà stabilisée du fait de la mutation activatrice R280K. Cela pourrait également être fait sur les lignées MCF7 et A375 « VIDE » et « PD-L1 » que nous avons générées afin de déterminer si, au contraire, une accumulation de p53 y modulerait la voie NRF2. Nous envisageons également d'évaluer

le métabolisme, et notamment les fonctions glycolytiques et de phosphorylation oxydative, des modèles MCF7 et A375 après les avoir infectés avec des plasmides lentiviraux codant les protéines p53-sauvage ou p53-R280K. Cela nous permettrait de conclure quant au rôle de cette mutation activatrice sur les fonctions métaboliques associées à l'expression de PD-L1.

5. Activité intrinsèque de PD-L1, effet de classe ?

Comme mentionné, les effets de PD-L1 et B7-H3 sur la voie NRF2 et le métabolisme sont très similaires. Aussi, nous pouvons nous demander si l'activité intrinsèque de PD-L1 provient d'un effet de classe. En effet, nous avons également mis en évidence des corrélations entre l'expression du gène *CD274/PD-L1* et des effecteurs de la voie NRF2 et avec l'expression des gènes glycolytiques, dans une base de données de cohortes de patients atteints de cancer du sein (**Figure 54, p.198**). De manière intéressante, ces mêmes corrélations ont été observées pour les gènes *CD80/B7-1* et *CD86/B7-2*, deux autres membres de la famille B7 (**Figure 55, p.199**). Nous pouvons de plus noter que l'expression de ces trois gènes est plus élevée dans le sous-type triple négatif, connu pour avoir le plus mauvais pronostic²⁵⁷. Ces dernières années, plusieurs protéines B7 telles que B7-H3 et B7-H4 ont été démontrées comme possédant des activités intrinsèques impactant une multitude de fonctions cellulaires (**Introduction, Partie 1, chapitre 4.4.**). Cela suggère un effet pléiotrope de ces molécules en plus de leur rôle de régulation du système immunitaire. Aussi, nous pouvons nous demander si le ciblage d'une seule de ces molécules en clinique, par exemple PD-L1, est suffisant pour rétablir une efficacité optimale de l'immunité anti-tumorale et réprimer les fonctions intrinsèques favorisant la croissance. Existerait-il des mécanismes compensatoires entre les différentes protéines B7, pouvant être à l'origine des résistances aux immunothérapies observées dans certains cancers ? Nous pouvons par exemple penser aux thérapies basées sur l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinases, dont les résistances intrinsèques et acquises limitent l'efficacité⁵⁹⁴. En effet, les mécanismes de résistance impliquent le transport et le métabolisme des médicaments, des modifications génétiques au niveau des structures cibles de ces inhibiteurs, mais aussi l'activation de voies de signalisation compensatoires⁵⁹⁴. Cette hypothèse d'effet de classe des membres de la famille B7 et de l'existence de potentiels mécanismes compensatoires nécessiterait une analyse plus approfondie, afin d'essayer de comprendre les mécanismes de résistance ou d'absence de réponse observés en clinique.

CONCLUSION GENERALE

Les cancers du sein triple négatifs (TNBC), décrits comme hétérogènes, sont particulièrement agressifs et couramment associés à un mauvais pronostic. Malgré des traitements par chimiothérapie ²⁵⁴, le taux de récurrence de ces tumeurs est plus important que celui des autres sous-types de cancer du sein ²⁵⁷. Par ailleurs, dans les cancers TNBC, le système immunitaire aurait un rôle bénéfique, la présence d'infiltrats de cellules de l'immunité au sein de ces tumeurs étant corrélée à un meilleur pronostic ^{254,258}. C'est d'autant plus marquant que la protéine d'immuno-suppression PD-L1 est fréquemment surexprimée dans ces pathologies malignes et est associée à une masse tumorale plus importante, à un stade avancé et à un index prolifératif élevé ²⁵³. En plus de réguler la réponse immunitaire, la protéine PD-L1 posséderait également des fonctions pro-tumorales intrinsèques, pour lesquelles les mécanismes moléculaires mis en œuvre sont encore inconnus.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein d'un laboratoire qui s'intéresse depuis quelques années au rôle de la protéine PD-L1, exprimée à la surface des cellules tumorales et ligand du récepteur lymphocytaire PD-1. Aussi, ce travail doctoral a permis de mettre en évidence des fonctions intrinsèques et des voies de signalisation induites par PD-L1, pouvant contribuer au développement des cancers du sein TNBC.

Nous avons démontré que l'isoforme 1 de PD-L1 favorise l'effet Warburg, caractérisé par le *shift* de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse. Le glucose étant principalement utilisé par les cellules cancéreuses pour favoriser la synthèse de biomolécules nécessaires à la progression tumorale, cela pourrait expliquer la tumorigénicité augmentée due à l'expression de PD-L1. Nos résultats laissent penser que cette reprogrammation métabolique pourrait être due à une répression par PD-L1 de la voie NRF2 de réponse au stress oxydatif, notamment de ses gènes cibles *NQO2*, *GSTM3* et *ABCC2*. L'élévation subséquente des niveaux de ROS intracellulaires engendrerait une stabilisation de la protéine HIF-1 α et favoriserait ainsi la voie glycolytique, promue par le facteur HIF-1. L'effet de la protéine PD-L1 dans la lignée MDA-MB-231 est résumé en **Figure 56**. En outre, l'analyse *in silico* de bases de données de patients atteints de cancer du sein a révélé une corrélation entre l'expression du gène *PD-L1/CD274* et l'expression de gènes de la voie du stress oxydant ou de gènes codant les transporteurs de glucose, supportant nos résultats obtenus *in vitro*. Ainsi, les travaux présentés dans cette thèse mettent en évidence de nouvelles fonctions intrinsèques de la protéine PD-L1, qui est capable de moduler la réponse anti-oxydante et le métabolisme du glucose des cellules TNBC, ceci pouvant promouvoir le développement tumoral. L'axe PD-1/PD-L1 ayant été démontré comme contribuant au phénomène

[Conclusion]

d'immuno-évasion tumoral suite à l'induction d'une compétition métabolique entre cellules immunitaires et cancéreuses de sarcome ²¹¹. Nos données suggèreraient un mécanisme similaire dans les tumeurs TNBC.

Par ailleurs, l'utilisation en clinique d'inhibiteurs de points de contrôle du système immunitaire (*immune checkpoints*), et notamment ceux ciblant PD-1/PD-L1, est un réel succès au niveau des pathologies tumorales solides et hématologiques ; néanmoins, il existe des formes réfractaires et de récurrence à ces traitements, suggérant l'existence de mécanismes de régulation plus complexes. Ce travail doctoral a mis en avant certaines perspectives de recherche qui mériteraient d'être approfondies et qui pourraient expliquer ces résistances observées. A savoir, quel rôle pourraient jouer les diverses localisations sub-cellulaire de PD-L1, la forme N-glycosylée de cette molécule ainsi que les différentes isoformes protéiques de PD-L1 ? D'autre part, il serait intéressant d'évaluer s'il existe un effet de classe entre les différentes molécules B7. Répondre à ces interrogations pourrait peut-être nous amener à réaliser des combinaisons de thérapies ayant une meilleure efficacité anti-tumorale et ainsi d'empêcher certaines récurrences de cancers.

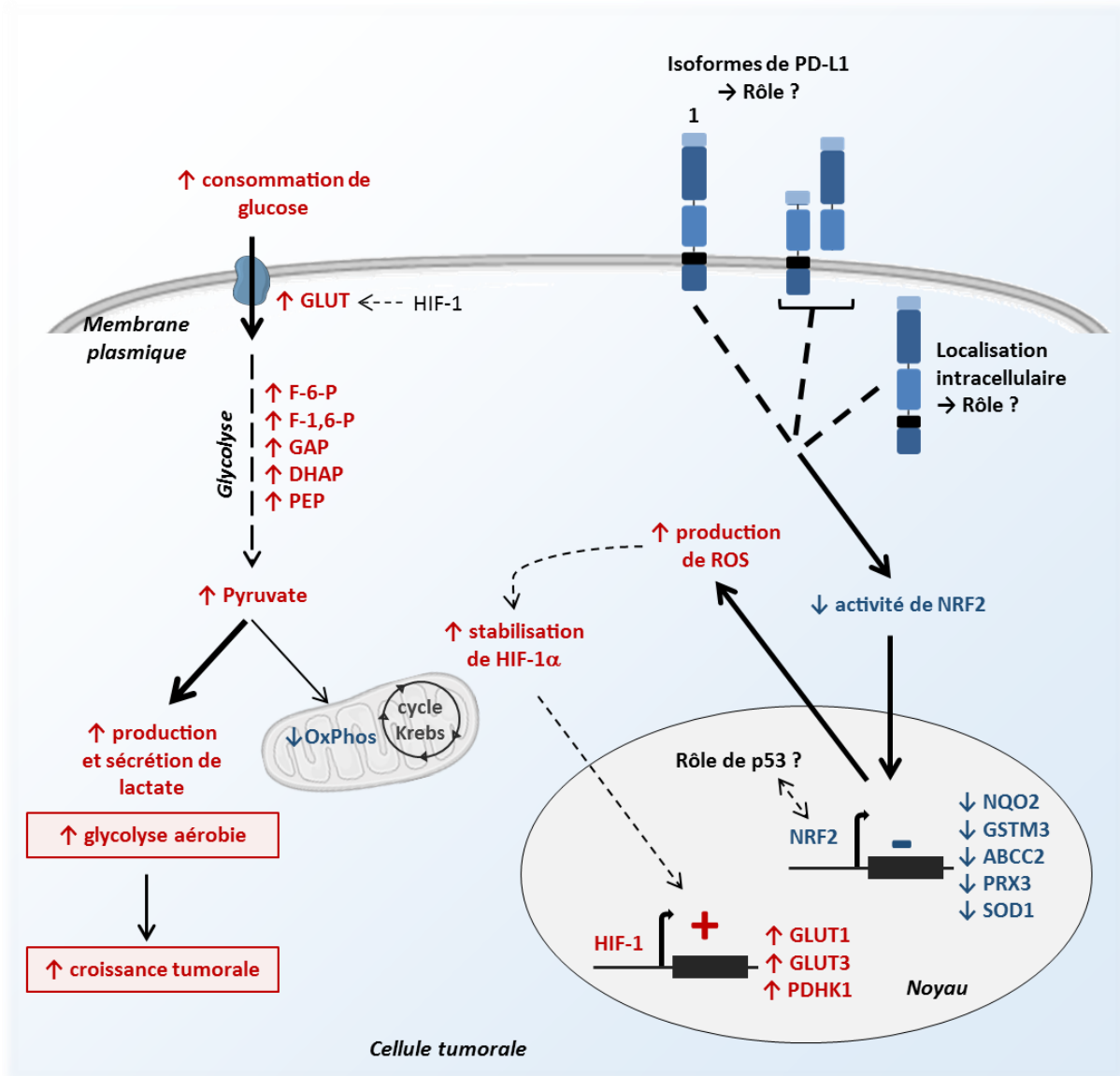


Figure 56: Conclusion générale, impact de l'expression de PD-L1 sur le métabolisme des cellules MDA-MB-231 PD-L1 diminue l'activité de NRF2; les mécanismes impliqués sont inconnus mais pourraient impliquer la localisation cellulaire de PD-L1 (membranaire et/ou intracellulaire), ou les différentes isoformes de PD-L1. La diminution de l'activité de ce facteur engendre une réduction de l'expression de ses cibles, comme les gènes anti-oxydants NQO2, GSTM3, ABCC2, PRX3 et SOD1. En conséquence, l'expression de PD-L1 augmente les niveaux de ROS dans les cellules cancéreuses, ce qui peut contribuer à la stabilisation de HIF-1 α , suivie d'une augmentation de l'expression de l'enzyme glycolytique PDHK1 et des transporteurs de glucose (GLUT1, GLUT3) dans les tumeurs. Ces changements entraînent une augmentation de la consommation de glucose et de la production de lactate. En accord avec ces données, les niveaux des intermédiaires de la glycolyse aérobie, tels que le F-6-P, le F-1,6-P, le GAP, le DHAP, le PEP et le pyruvate, sont augmentés dans les cellules exprimant PD-L1. De plus, le métabolisme mitochondrial est réduit dans les cellules « PD-L1 », comme en témoigne la diminution de la phosphorylation oxydative. Cette reprogrammation métabolique favorise la croissance tumorale *in vivo*.

RÉFÉRENCES

RÉFÉRENCES

1. Burnet, M. Cancer - A biological approach. *Br. Med. J.* **1**, 779–86 (1957).
2. Ribatti, D. The concept of immune surveillance against tumors: The first theories. *Oncotarget* **8**, 7175–7180 (2017).
3. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**, 991–998 (2002).
4. Dunn, G. P., Koebel, C. M. & Schreiber, R. D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 836–848 (2006).
5. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science (80-.)*. **331**, 1565–1570 (2011).
6. Bui, J. D. & Schreiber, R. D. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 203–208 (2007).
7. Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K. & Nakachi, K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* **356**, 1795–1799 (2000).
8. Pagès, F. Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2007**, 307–308 (2007).
9. Borrego, F. The First Molecular Basis of the 'Missing Self' Hypothesis. *J. Immunol.* **177**, 5759–5760 (2006).
10. Kärre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G. & Kiessling, R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* **319**, 675–678 (1986).
11. Moretta, L. & Moretta, A. Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 626–633 (2004).
12. Diefenbach, A. & Raulet, D. H. Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunol Rev* **181**, 170–184 (2001).
13. Lanier, L. L. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* **9**, 495–502 (2008).
14. Smyth, M. J., Hayakawa, Y., Takeda, K. & Yagita, H. New Aspects Of Natural-Killer-Cell Surveillance And Therapy Of Cancer. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 827–837 (2002).
15. Terme, M., Ullrich, E., Delahaye, N. F., Chaput, N. & Zitvogel, L. Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat. Immunol.* **9**, 486–494 (2008).
16. Liu, C. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 1165–1175 (2008).
17. Godfrey, D. I., MacDonald, H. R., Kronenberg, M., Smyth, M. J. & Van Kaer, L. NKT cells: what's in a name? *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 231–237 (2004).
18. Park, S.-H., Kyin, T., Bendelac, A. & Carnaud, C. The contribution of NKT cells, NK cells, and other gamma-chain-dependent non-T non-B cells to IL-12-mediated rejection of tumors. *J. Immunol.* **170**, 1197–1201 (2003).
19. Cui, J. *et al.* Requirement for V α 14 NKT Cells in IL-12-Mediated Rejection of Tumors. *Science (80-.)*. **278**, 1623–1626 (1997).
20. Kawano, T. *et al.* Advances in Brief Antitumor Cytotoxicity Mediated by Ligand-activated Human V α 24 NKT Cells. **4**, 5102–5105 (1999).
21. Smyth, M. J. *et al.* Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J. Exp. Med.* **191**, 661–668 (2000).
22. Janeway, C. A. & Medzhitov, R. Innate Immune Recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216 (2002).

[Références]

23. Toes, R. E. M., Ossendorp, F., Offringa, R. & Melief, C. J. M. CD4 T Cells and Their Role in Antitumor Immune Responses. *J. Exp. Medicine* **189**, 753–756 (1999).
24. Turley, S. J. *et al.* Transport of Peptide-MHC Class II Complexes in Developing Dendritic Cells. *Science* (80-.). **288**, 522–527 (2000).
25. Grivnenikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883–899 (2010).
26. Steinman, R. M. & Banchereau, J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* **449**, 419–426 (2007).
27. Shankaran, V. *et al.* IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107–1111 (2001).
28. Ladányi, A. *et al.* Density of DC-LAMP+ mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor. *Cancer Immunol. Immunother.* **56**, 1459–1469 (2007).
29. Hadrup, S., Donia, M. & Thor Straten, P. Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron.* **6**, 123–133 (2013).
30. Zhang, N. & Bevan, M. J. CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity* **35**, 161–168 (2011).
31. Lim, W. A. & June, C. H. The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. *Cell* **168**, 724–740 (2017).
32. Lieberman, J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 361–370 (2003).
33. Krammer, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789–795 (2000).
34. Williamson, B. D., Carswell, E. a, Rubin, B. Y., Prendergast, J. S. & Old, L. J. Human tumor necrosis factor produced by human B-cell lines: synergistic cytotoxic interaction with human interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 5397–401 (1983).
35. Pfizenmaier, K. *et al.* Differential gamma-interferon response of human colon carcinoma cells: inhibition of proliferation and modulation of immunogenicity as independent effects of gamma-interferon on tumor cell growth. **45**, 3503–3509 (1985).
36. Coughlin, C. M. *et al.* Tumor cell responses to IFN γ affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. *Immunity* **9**, 25–34 (1998).
37. Greenberg PD, Reusser P, Goodrich JM, R. S. Development of a Treatment Regimen for Human Cytomegalovirus (CMV) Infection in Bone Marrow Transplantation Recipients by Adoptive Transfer of Donor-Derived CMV-Specific T Cell Clones Expanded In Vitro. *Ann. New York Acad. Sci.* **636**, 184–95 (1991).
38. Aggarwal, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 745–756 (2003).
39. Qin, Z. *et al.* A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells. *Cancer Res.* **63**, 4095–4100 (2003).
40. Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. & Howard, J. C. Cellular Responses To Interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 749–95 (1997).
41. Poehlein, C. H. *et al.* TNF plays an essential role in tumor regression after adoptive transfer of perforin/IFN-gamma double knockout effector T cells. *J. Immunol.* **170**, 2004–13 (2003).
42. Kennedy, R. & Celis, E. Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol. Rev.* **222**, 129–144 (2008).
43. Rahir, G. & Moser, M. Tumor microenvironment and lymphocyte infiltration. *Cancer Immunol. Immunother.* **61**, 751–759 (2012).
44. Fearon, E. R. *et al.* Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell* **60**, 397–403 (1990).
45. Rosenberg, S. A., Yang, J. C., White, D. E. & Steinberg, S. M. Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. *Ann. Surg.* **228**, 307–319 (1998).
46. Giuntoli li, R. L., Lu, J., Kobayashi, H., Kennedy, R. & Celis, E. Direct Costimulation of Tumor-reactive CTL by Helper T Cells Potentiate Their Proliferation, Survival, and

- Effector Function. **8**, 922–931 (2002).
47. Hung, K. *et al.* The Central Role of CD4+ T Cells in the Antitumor Immune Response. *J. Exp. Med.* **188**, 2357–2368 (1998).
 48. Mattes, J. *et al.* Immunotherapy of Cytotoxic T Cell-resistant Tumors by T Helper 2 Cells: An Eotaxin and STAT6-dependent Process. *J. Exp. Med.* **197**, 387–393 (2003).
 49. Thomas, W. & Hersey, P. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells. *J. Immunol. (Baltimore, Md 1950)* **161**, 2195–2200 (1998).
 50. Echchakir, H. *et al.* Cutaneous T cell lymphoma reactive CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones display a Th1 cytokine profile and use a Fas-independent pathway for specific tumor cell lysis. *J. Invest. Dermatol.* **115**, 74–80 (2000).
 51. Lundin, K. U. *et al.* Therapeutic effect of idiotype-specific CD4+ T cells against B-cell lymphoma in the absence of anti-idiotypic antibodies. *Blood* **102**, 605–612 (2003).
 52. Flynn, S. & Stockinger, B. Tumor and CD4 T-cell interactions: Tumor escape as result of reciprocal inactivation. *Blood* **101**, 4472–4478 (2003).
 53. Jonuleit, H. *et al.* Infectious Tolerance: Human CD25+ Regulatory T Cells Convey Suppressor Activity to Conventional CD4+ T Helper Cells. *J. Exp. Med.* **196**, 255–260 (2002).
 54. Fehérvári, Z. & Sakaguchi, S. CD4+ Tregs and immune control. *J. Clin. Invest.* **114**, 1209–1217 (2004).
 55. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
 56. Aguirre-Ghiso, J. A. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 834–846 (2007).
 57. Quesnel, B. Tumor dormancy: long-term survival in a hostile environment. *Adv. Exp. Med. Biol.* **734**, 181–200 (2013).
 58. Koebel, C. M. *et al.* Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* **450**, 903–907 (2007).
 59. Vitetta, E. S. *et al.* Tumor dormancy and cell signaling. V. Regrowth of the BCL1 tumor after dormancy is established. *Blood* **89**, 4425–36 (1997).
 60. Loeser, S. *et al.* Spontaneous tumor rejection by cbl-b –deficient CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* **204**, 879–891 (2007).
 61. Saudemont, A. & Quesnel, B. In a model of tumor dormancy, long-term persistent leukemic cells have increased B7-H1 and B7.1 expression and resist CTL-mediated lysis. *Blood* **104**, 2124–33 (2004).
 62. Mueller, M. M. & Fusenig, N. E. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 839–849 (2004).
 63. Dannenberg, A. J. & Subbaramaiah, K. Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: Rationale and promise. *Cancer Cell* **4**, 431–436 (2003).
 64. Balkwill, F., Charles, K. A. & Mantovani, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* **7**, 211–217 (2005).
 65. Spiotto, M. T., Rowley, D. A. & Schreiber, H. Bystander elimination of antigen loss variants in established tumors. *Nat. Med.* **10**, 294–298 (2004).
 66. Bai, X. F., Liu, J., Li, O., Zheng, P. & Liu, Y. Antigenic drift as a mechanism for tumor evasion of destruction by cytolytic T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* **111**, 1487–1496 (2003).
 67. Jäger, E. *et al.* Cytolytic T cell reactivity against melanoma-associated differentiation antigens in peripheral blood of melanoma patients and healthy individuals. *Melanoma Res.* **6**, 419–25 (1996).
 68. Seliger, B., Cabrera, T., Garrido, F. & Ferrone, S. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin. Cancer Biol.* **12**, 3–13 (2002).
 69. Reiman, J. M., Kmiecik, M., Manjili, M. H. & Knutson, K. L. Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression. *Semin. Cancer Biol.* **17**, 275–287 (2007).
 70. Van der Burg, S. H., Arens, R., Ossendorp, F., van Hall, T. & Melief, C. J. M. Vaccines

- for established cancer: overcoming the challenges posed by immune evasion. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 219–233 (2016).
71. Zitvogel, L., Tesniere, A. & Kroemer, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 715–727 (2006).
 72. Garcia-Lora, A., Algarra, I. & Garrido, F. MHC Class I Antigens, Immune Surveillance, and Tumor Immune Escape. *J. Cell. Physiol.* **195**, 346–355 (2003).
 73. Pinkoski, M. J. & Green, D. R. Cloak and dagger in the avoidance of immune surveillance. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 114–119 (2000).
 74. Pitti, R. M. *et al.* Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* **396**, 699–703 (1998).
 75. Roth, W. *et al.* Soluble decoy receptor 3 is expressed by malignant gliomas and suppresses CD95 ligand-induced apoptosis and chemotaxis. *Cancer Res.* **61**, 2759–2765 (2001).
 76. Takahama, Y. *et al.* The prognostic significance of overexpression of the decoy receptor for Fas ligand (DcR3) in patients with gastric carcinomas. *Gastric Cancer* **5**, 61–68 (2002).
 77. Ambrosini, G., Adida, C. & Altieri, D. C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* **3**, 917–21 (1997).
 78. Rochaix, P. *et al.* In vivo patterns of Bcl-2 family protein expression in breast carcinomas in relation to apoptosis. *J. Pathol.* **187**, 410–5 (1999).
 79. Yin, C., Knudson, C. M., Korsmeyer, S. J. & Van Dyke, T. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* **385**, 637–640 (1997).
 80. Medema, J., De Jong, J., Van Hall, T., Melief, C. & Offringa, R. Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein. *J Exp Med* **190**, 1033–1038 (1999).
 81. Strand, S. *et al.* Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat. Med.* **2**, 1361–6 (1996).
 82. Bennett *et al.* The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. *J. Immunol.* **160**, 5669–75 (1998).
 83. Hahne, M. *et al.* Melanoma Cell Expression of Fas(Apo1/CD95) Ligand: Implications for Tumor Immune Escape. *Science (80-)*. **274**, 1363–1366 (1994).
 84. Seino, K., Kayagaki, N., Okumura, K. & Yagita, H. Antitumor effect of locally produced CD95 ligand. *Nat. Med.* **3**, 165–70 (1997).
 85. Hersey, P. & Zhang, X. D. How melanoma cells evade TRAIL-induced apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 142–150 (2001).
 86. Grimm, M. *et al.* Tumour-mediated TRAIL-Receptor expression indicates effective apoptotic depletion of infiltrating CD8+ immune cells in clinical colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* **46**, 2314–2323 (2010).
 87. Medema, J. P. *et al.* Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *PNAS* **98**, 11515–20 (2001).
 88. Godal, R. *et al.* Lymphomas are sensitive to perforin-dependent cytotoxic pathways despite expression of PI-9 and overexpression of bcl-2. *Blood* **107**, 3205–3211 (2006).
 89. Lehmann, C., Zeis, M., Schmitz, N. & Uharek, L. Impaired binding of perforin on the surface of tumor cells is a cause of target cell resistance against cytotoxic effector cells. *Blood* **96**, 594–600 (2000).
 90. Moore, K. W., De Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 683–765 (2001).
 91. Couper, K. N., Blount, D. G. & Riley, E. M. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J. Immunol.* **180**, 5771–5777 (2008).
 92. Yang, A. S. & Lattime, E. C. Tumor-induced Interleukin 10 Suppresses the Ability of Splenic Dendritic Cells to Stimulate CD4 and CD8 T-Cell Responses. *Cancer Res.* **63**, 2150–2157 (2003).
 93. Steinbrink, K. *et al.* Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-

- antigen-specific anergy in CD8+ T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* **93**, 1634–42 (1999).
94. Yue, F. Y. *et al.* Interleukin-10 Is a Growth Factor for Human Melanoma Cells and Down-Regulates HLA Class-I, HLA Class-II and ICAM-1 Molecules. *Int. J. Cancer* **71**, 630–637 (1997).
 95. Raulet, D. H. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 781–790 (2003).
 96. Märten, A., Von Lilienfeld-Toal, M., Büchler, M. W. & Schmidt, J. Soluble MIC is elevated in the serum of patients with pancreatic carcinoma diminishing gammadelta T cell cytotoxicity. *Int. J. Cancer* **119**, 2359–2365 (2006).
 97. Holdenrieder, S. *et al.* Soluble MICB in malignant diseases: Analysis of diagnostic significance and correlation with soluble MICA. *Cancer Immunol. Immunother.* **55**, 1584–1589 (2006).
 98. Nüchel, H. *et al.* The prognostic significance of soluble NKG2D ligands in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **24**, 1152–1159 (2010).
 99. Munn, D. H. & Mellor, A. L. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol.* **34**, 137–143 (2013).
 100. Munn, D. H. & Mellor, A. L. IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. *Trends Immunol.* **37**, 193–207 (2016).
 101. Della Chiesa, M. *et al.* The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. *Blood* **108**, 4118–4125 (2006).
 102. Ohm, J. E. & Carbone, D. P. VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency. *Immunol. Res.* **23**, 263–272 (2001).
 103. Curigliano, G., Criscitiello, C., Gelao, L. & Goldhirsch, A. Molecular Pathways: Human Leukocyte Antigen G (HLA-G). *Clin. Cancer Res.* **19**, 5564–5571 (2013).
 104. Lin, A. & Yan, W.-H. Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) Expression in Cancers: Roles in Immune Evasion, Metastasis and Target for Therapy. *Mol. Med.* **21**, 782–791 (2015).
 105. Sheu, J. & Shih, I.-M. HLA-G and Immune Evasion in Cancer Cells. *J. Formos. Med. Assoc.* **109**, 248–257 (2010).
 106. Liu, F.-T. & Rabinovich, G. A. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 29–41 (2005).
 107. Massagué, J. TGF β in Cancer. *Cell* **134**, 215–230 (2008).
 108. Rich, S., Van Nood, N. & Lee, H. M. Role of alpha 5 beta 1 integrin in TGF-beta 1-costimulated CD8+ T cell growth and apoptosis. *J. Immunol.* **157**, 2916–2923 (1996).
 109. Cerwenka, A., Kovar, H., Majdic, O. & Holter, W. Fas- and Activation-Induced Apoptosis Are Reduced In Human T Cells Preactivated In the Presence of TGF-B1. *J. Immunol.* **156**, 459–464 (1996).
 110. Swain, S. L., Huston, G., Tonkonogy, S. & Weinberg, A. Transforming growth factor-beta and IL-4 cause helper T cell precursors to develop into distinct effector helper cells that differ in lymphokine secretion pattern and cell surface phenotype. *J. Immunol.* **147**, 2991–3000 (1991).
 111. Bierie, B. & Moses, H. L. Transforming growth factor beta (TGF- β) and inflammation in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**, 49–59 (2010).
 112. Marie, J. C., Letterio, J. J., Gavin, M. & Rudensky, A. Y. TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **201**, 1061–1067 (2005).
 113. Mamura, M. *et al.* CD28 disruption exacerbates inflammation in Tgf-B1-/- mice: in vivo suppression by CD4+ CD25+ regulatory T cells independent of autocrine TGF-B1. **103**, 4594–4601 (2004).
 114. Zhou, X. *et al.* TGF- β 1 promotes colorectal cancer immune escape by elevating B7-H3 and B7-H4 via the miR-155/miR-143 axis. *Oncotarget* **7**, 67196–67211 (2016).
 115. Kalinski, P. Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E2. *J. Immunol.* **188**, 21–28 (2012).

[Références]

116. Wang, D. & DuBois, R. N. The role of prostaglandin E2 in tumor-associated immunosuppression. *Trends Mol. Med.* **22**, 367–402 (2016).
117. Zeddou, M. *et al.* Prostaglandin E2 induces the expression of functional inhibitory CD94/NKG2A receptors in human CD8+ T lymphocytes by a cAMP-dependent protein kinase A type I pathway. *Biochem. Pharmacol.* **70**, 714–724 (2005).
118. Sreeramkumar, V., Fresno, M. & Cuesta, N. Prostaglandin E2 and T cells: friends or foes? *Immunol. Cell Biol.* **90**, 579–586 (2012).
119. Schildberg, F. A., Klein, S. R., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity* **44**, 955–972 (2016).
120. Dong, H. *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* **8**, 793–800 (2002).
121. Hamanishi, J. *et al.* Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *PNAS* **104**, 3360–5 (2007).
122. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 329–360 (2004).
123. Almand, B. *et al.* Clinical Significance of Defective Dendritic Cell Differentiation in Cancer Clinical Significance of Defective Dendritic Cell Differentiation. *Clin. Cancer Res.* **6**, 1755–1766 (2000).
124. Hartmann, E. *et al.* Identification and Functional Analysis of Tumor-Infiltrating Plasmacytoid Dendritic Cells in Head and Neck Cancer 1. *Cancer Res.* **63**, 6478–6487 (2003).
125. Gabrilovich, D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 941–952 (2004).
126. Zou, W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 295–307 (2006).
127. Chaudhary, B. & Elkord, E. Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment and Cancer Progression: Role and Therapeutic Targeting. *Vaccines* **28**, (2016).
128. Facciabene, A., Motz, G. T. & Coukos, G. T-Regulatory cells: Key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Res.* **72**, 2162–2171 (2012).
129. Zou, W. & Restifo, N. P. Th17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 248–256 (2010).
130. Muranski, P. *et al.* Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* **112**, 362–373 (2008).
131. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 23–35 (2003).
132. Gajewski, T. F., Schreiber, H. & Fu, Y.-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat. Immunol.* **14**, 1014–1022 (2013).
133. Quail, D. F. & Joyce, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* **19**, 1423–1437 (2013).
134. Pollard, J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 71–78 (2004).
135. Noy, R. & Pollard, J. W. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity* **41**, 49–61 (2014).
136. Kaler, P., Galea, V., Augenlicht, L. & Klampfer, L. Tumor associated macrophages protect colon cancer cells from TRAIL-induced apoptosis through IL-1 β - dependent stabilization of snail in tumor cells. *PLoS One* **5**, (2010).
137. Serafini, P., Borrello, I. & Bronte, V. Myeloid suppressor cells in cancer: Recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin. Cancer Biol.* **16**, 53–65 (2006).
138. Kakarla, S., Song, X.-T. & Gottschalk, S. Cancer-associated fibroblasts as targets for immunotherapy. *Immunotherapy* **4**, 1129–38 (2012).
139. Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science (80-.)*. **284**, 143–147 (1999).
140. Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 726–736 (2008).

141. Tommelein, J. *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts Connect Metastasis-Promoting Communication in Colorectal Cancer. *Front. Oncol.* **5**, 1–11 (2015).
142. Protti, M. P. & De Monte, L. Cross-talk within the tumor microenvironment mediates Th2-type inflammation in pancreatic cancer. *Oncoimmunology* **1**, 89–91 (2012).
143. Attanasio, J. & Wherry, E. J. Costimulatory and Coinhibitory Receptor Pathways in Infectious Disease. *Immunity* **44**, 1052–1068 (2016).
144. Callahan, M. K., Postow, M. A. & Wolchok, J. D. Targeting T Cell Co-receptors for Cancer Therapy. *Immunity* **44**, 1069–1078 (2016).
145. Zhang, Q. & Vignali, D. A. A. Co-stimulatory and Co-inhibitory Pathways in Autoimmunity. *Immunity* **44**, 1034–1051 (2016).
146. Ford, M. L. T Cell Cosignaling Molecules in Transplantation. *Immunity* **44**, 1020–1033 (2016).
147. Le Mercier, I., Lines, J. L. & Noelle, R. J. Beyond CTLA-4 and PD-1, the generation Z of negative checkpoint regulators. *Front. Immunol.* **6**, 1–15 (2015).
148. Greenwald, R. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 515–548 (2005).
149. Esensten, J. H., Helou, Y. A., Chopra, G., Weiss, A. & Bluestone, J. A. CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity* **44**, 973–988 (2016).
150. Bour-Jordan, H. *et al.* CTLA-4 regulates the requirement for cytokine-induced signals in T(H)2 lineage commitment. *Nat. Immunol.* **4**, 182–8 (2003).
151. Topalian, S. L., Drake, C. G. & Pardoll, D. M. Immune checkpoint blockade: A common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* **27**, 451–461 (2015).
152. Anderson, A. C., Joller, N. & Kuchroo, V. K. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity* **44**, 989–1004 (2016).
153. Arnett, H. a & Viney, J. L. Immune modulation by butyrophilins. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 559–69 (2014).
154. Nirschl, C. J. & Drake, C. G. Molecular pathways: Coexpression of immune checkpoint molecules: Signaling pathways and implications for cancer immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* **19**, 4917–4924 (2013).
155. Chen, L. & Han, X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present and future. *J. Clin. Invest.* **125**, (2015).
156. Lin, D. Y.-W. *et al.* The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3011–3016 (2008).
157. Zou, W. & Chen, L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 467–477 (2008).
158. Butte, M. J., Keir, M. E., Phamduy, T. B., Sharpe, A. H. & Freeman, G. J. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* **27**, 111–22 (2007).
159. Wang, S. *et al.* Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction. *J. Exp. Med.* **197**, 1083–1091 (2003).
160. Patsoukis, N. *et al.* PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat. Commun.* **6**, 6692 (2015).
161. Francisco, L. M. *et al.* PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **206**, 3015–3029 (2009).
162. He, J., Hu, Y., Hu, M. & Li, B. Development of PD-1/PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer. *Sci. Rep.* **5**, 1–9 (2015).
163. Gordon, S. R. *et al.* PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature* **545**, 495–499 (2017).
164. Jr Benson, D. M. *et al.* The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood* **116**, 2286–2294 (2010).

165. Azuma, T. *et al.* B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood* **111**, 3635–43 (2008).
166. Hui, E. *et al.* T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1–mediated inhibition. *Science* (80-.). **355**, 1428–1433 (2017).
167. Kamphorst, A. O. *et al.* Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1–targeted therapies is CD28-dependent. *Science* (80-.). **355**, 1423–1427 (2017).
168. Collins, M., Ling, V. & Carreno, B. M. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol.* **6**, 223 (2005).
169. Zang, X. & Allison, J. P. The B7 family and cancer therapy: Costimulation and coinhibition. *Clin. Cancer Res.* **13**, 5271–5279 (2007).
170. Greaves, P. & Gribben, J. G. The role of B7 family molecules in hematologic malignancy. *Blood* **121**, 734–44 (2013).
171. Yinxin, Z., Jing, S. & Zhangang, X. B7 Gene Family: Promising Immunotherapeutic Checkpoint in Cancers. *Clin. Oncol.* **2**, 1–2 (2017).
172. Ni, L. & Dong, C. New B7 Family Checkpoints in Human Cancers. *Mol. Cancer Ther.* **16**, 1203–1212 (2017).
173. Flajnik, M. F., Tlapakova, T., Criscitiello, M. F., Krylov, V. & Ohta, Y. Evolution of the B7 family: Co-evolution of B7H6 and NKp30, identification of a new B7 family member, B7H7, and of B7's historical relationship with the MHC. *Immunogenetics* **64**, 571–590 (2012).
174. Hansen, J. D. *et al.* The B7 family of immunoregulatory receptors: A comparative and evolutionary perspective. *Mol. Immunol.* **46**, 457–472 (2009).
175. Vereecque, R., Saudemont, a & Quesnel, B. Cytosine arabinoside induces costimulatory molecule expression in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* **18**, 1223–30 (2004).
176. Keir, M. E., Francisco, L. M. & Sharpe, A. H. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 309–14 (2007).
177. Butte, M. J., Peña-Cruz, V., Kim, M.-J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. Interaction of human PD-L1 and B7-1. *Mol. Immunol.* **45**, 3567–3572 (2008).
178. Saudemont, A., Jouy, N., Hetuin, D. & Quesnel, B. NK cells that are activated by CXCL10 can kill dormant tumor cells that resist CTL-mediated lysis and can express B7-H1 that stimulates T cells. *Blood* **105**, 2428–35 (2005).
179. Chen, J.-T. *et al.* Glycoprotein B7-H3 overexpression and aberrant glycosylation in oral cancer and immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201516991 (2015). doi:10.1073/pnas.1516991112
180. Ingebrigtsen, V. A. *et al.* B7-H3 expression in colorectal cancer: nuclear localization strongly predicts poor outcome in colon cancer. *Int. J. Cancer* **131**, 2528–36 (2012).
181. Janakiram, M. *et al.* The third group of the B7-CD28 immune checkpoint family: HHLA2, TMIGD2, B7x, and B7-H3. *Immunol. Rev.* **276**, 26–39 (2017).
182. Chen, R. *et al.* Glycoproteomics analysis of human liver tissue by combination of multiple enzyme digestion and hydrazide chemistry. *J. Proteome Res.* **8**, 651–661 (2009).
183. Singh, A., Stock, P. & Akbari, O. Role of PD-L1 and PD-L2 in allergic diseases and asthma. *Allergy* **66**, 155–162 (2012).
184. He, X. H., Xu, L. H. & Liu, Y. Identification of a novel splice variant of human PD-L1 mRNA encoding an isoform-lacking IgV-like domain. *Acta Pharmacol. Sin.* **26**, 462–468 (2005).
185. Brodska, B., Otevrelva, P. & Kuzelova, K. Correlation of PD-L1 surface expression on leukemia cells with the ratio of PD-L1 mRNA variants and with electrophoretic mobility. *Cancer Immunol. Res.* (2016). doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0063
186. Frigola, X. *et al.* Identification of a soluble form of B7-H1 that retains immunosuppressive activity and is associated with aggressive renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **17**, 1915–1923 (2011).
187. Frigola, X. *et al.* Soluble B7-H1: Differences in production between dendritic cells and T cells. *Immunol. Lett.* **142**, 78–82 (2012).

188. Rossille, D. *et al.* High level of soluble programmed cell death ligand 1 in blood impacts overall survival in aggressive diffuse large B-Cell lymphoma: results from a French multicenter clinical trial. *Leukemia* (2014). doi:10.1038/leu.2014.137
189. Mezzadra, R. *et al.* Identification of CMTM6 and CMTM4 as PD-L1 protein regulators. *Nature* **549**, 106–110 (2017).
190. Burr, M. L. *et al.* CMTM6 maintains the expression of PD-L1 and regulates anti-tumour immunity. *Nature* **549**, 101–105 (2017).
191. Huang, X. *et al.* Identification of B7-H1 as a novel mediator of the innate immune/proinflammatory response as well as a possible myeloid cell prognostic biomarker in sepsis. *J. Immunol.* **192**, 1091–9 (2014).
192. Afreen, S. & Dermime, S. The immunoinhibitory B7-H1 molecule as a potential target in cancer: killing many birds with one stone. *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.* **7**, 1–17 (2014).
193. Ostrand-Rosenberg, S., Horn, L. a. & Haile, S. T. The Programmed Death-1 Immune-Suppressive Pathway: Barrier to Antitumor Immunity. *J. Immunol.* **193**, 3835–3841 (2014).
194. Liu, J. *et al.* Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood* **110**, 296–304 (2007).
195. Barsoum, I. B., Smallwood, C. a, Siemens, D. R. & Graham, C. H. A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. *Cancer Res.* **74**, 665–74 (2014).
196. Pulko, V. *et al.* B7-H1 expressed by activated CD8 T cells is essential for their survival. *J. Immunol.* **187**, 5606–5614 (2011).
197. Tamura, H. *et al.* B7-H1 costimulation preferentially enhances CD28-independent T-helper cell function. *Blood* **97**, 1809–1816 (2001).
198. Uhr, J. W. & Pantel, K. Controversies in clinical cancer dormancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 12396–400 (2011).
199. Gelao, L. *et al.* Tumour dormancy and clinical implications in breast cancer. *Ecancermedicalsecience* **7**, 320 (2013).
200. Saudemont, A. *et al.* Dormant tumor cells develop cross-resistance to apoptosis induced by CTLs or imatinib mesylate via methylation of suppressor of cytokine signaling 1. *Cancer Res.* **67**, 4491–8 (2007).
201. Taube, J. M. *et al.* Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci. Transl. Med.* **4**, 127ra37 (2012).
202. Velcheti, V. *et al.* Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab. Invest.* **94**, 107–16 (2014).
203. Kim, Y. S. *et al.* Cross-linking of B7-H1 on EBV-transformed B cells induces apoptosis through reactive oxygen species production, JNK signaling activation, and fasL expression. *J. Immunol.* **181**, 6158–6169 (2008).
204. Curiel, T. J. *et al.* Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat. Med.* **9**, 548–553 (2003).
205. Dong, H., Zhu, G., Tamada, K. & Chen, L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.* **5**, 1365–1369 (1999).
206. Wang, J. *et al.* Cutting Edge: CD28 Engagement Releases Antigen-Activated Invariant NKT Cells from the Inhibitory Effects of PD-1. *J. Immunol.* **182**, 6644–6647 (2009).
207. Okazaki, T., Maeda, A., Nishimura, H., Kurosaki, T. & Honjo, T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 13866–13871 (2001).
208. Yao, S. *et al.* PD-1 on dendritic cells impedes innate immunity against bacterial infection. *Blood* **113**, 5811 (2009).
209. Kearney, C. J. *et al.* PD-L1 and IAPs co-operate to protect tumors from cytotoxic

- lymphocyte-derived TNF. *Cell Death Differ.* 1–12 (2017). doi:10.1038/cdd.2017.94
210. Lim, S. *et al.* Interplay between immune checkpoint proteins and cellular metabolism. *Cancer Res.* **77**, 1245–1249 (2017).
211. Chang, C. *et al.* Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell* 1–13 (2015). doi:10.1016/j.cell.2015.08.016
212. Siska, P. J. *et al.* Suppression of Glut1 and Glucose Metabolism by Decreased Akt/mTORC1 Signaling Drives T Cell Impairment in B Cell Leukemia. *J. Immunol.* 1502464 (2016). doi:10.4049/jimmunol.1502464
213. Qorraj, M. *et al.* The PD-1/PD-L1 axis contributes to immune metabolic dysfunctions of monocytes in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* (2016). doi:10.1038/leu.2016.214
214. Watanabe, R. *et al.* Pyruvate controls the checkpoint inhibitor PD-L1 and suppresses T cell immunity. *J. Clin. Invest.* **127**, 2725–2738 (2017).
215. Zhang, W. *et al.* B7-H3 silencing by RNAi inhibits tumor progression and enhances chemosensitivity in U937 cells. *Onco. Targets. Ther.* **8**, 1721–1733 (2015).
216. Fauci, J. M. *et al.* Monoclonal antibody-based immunotherapy of ovarian cancer: targeting ovarian cancer cells with the B7-H3-specific mAb 376.96. *Gynecol. Oncol.* **132**, 203–210 (2014).
217. Zhang, W. *et al.* B7-H3 silencing inhibits tumor progression of mantle cell lymphoma and enhances chemosensitivity. *Int. J. Oncol.* (2015). doi:10.3892/ijo.2015.2962
218. Zhang, L. *et al.* The costimulatory molecule B7-H4 promote tumor progression and cell proliferation through translocating into nucleus. *Oncogene* **32**, 5347–58 (2013).
219. Zhang, X., Cai, L., Zhang, G., Shen, Y. & Huang, J. B7-H4 promotes tumor growth and metastatic progression in lung cancer by impacting cell proliferation and survival. *Oncotarget* **8**, 1–11 (2017).
220. Salceda, S. *et al.* The immunomodulatory protein B7-H4 is overexpressed in breast and ovarian cancers and promotes epithelial cell transformation. *Exp. Cell Res.* **306**, 128–141 (2005).
221. Chen, X., Wang, W., Man, H., Li, P. & Shan, B. Increased B7-H4 expression during esophageal squamous cell carcinogenesis is associated with IL-6/STAT3 signaling pathway activation in mice. *Oncol. Lett.* 2207–2215 (2016). doi:10.3892/ol.2017.5688
222. Jeon, Y.-K. *et al.* Cancer cell-associated cytoplasmic B7-H4 is induced by hypoxia through hypoxia-inducible factor-1 α and promotes cancer cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2015). doi:10.1016/j.bbrc.2015.02.098
223. Sun, J. *et al.* B7-H3 expression in breast cancer and upregulation of VEGF through gene silence. *Onco. Targets. Ther.* 1979–1986 (2014).
224. Tamai, K. *et al.* Suppressive expression of CD274 increases tumorigenesis and cancer stem cell phenotypes in cholangiocarcinoma. *Cancer Sci.* **105**, 667–674 (2014).
225. Yang, Y. *et al.* B7-H1 enhances proliferation ability of gastric cancer stem-like cells as a receptor. *Oncol. Lett.* **9**, 1833–1838 (2015).
226. Almozyan, S. *et al.* PD-L1 promotes OCT4 and Nanog expression in breast cancer stem cells by sustaining PI3K/AKT pathway activation. *Int. J. cancer* (2017). doi:10.1002/ijc.30834
227. Liu, H. *et al.* B7-H3 silencing increases paclitaxel sensitivity by abrogating Jak2/Stat3 phosphorylation. *Mol. Cancer Ther.* **10**, 960–71 (2011).
228. Zhang, T. Overexpression of B7-H3 augments anti-apoptosis of colorectal cancer cells by Jak2-STAT3. *World J. Gastroenterol.* **21**, 1804 (2015).
229. Zhao, X. *et al.* Silencing of B7-H3 increases gemcitabine sensitivity by promoting apoptosis in pancreatic carcinoma. *Oncol. Lett.* **5**, 805–812 (2013).
230. Nunes-Xavier, C. E. *et al.* Decreased expression of B7-H3 reduces the glycolytic capacity and sensitizes breast cancer cells to AKT/mTOR inhibitors. *Oncotarget* **7**, 6891–901 (2016).
231. Flem-Karlsen, K. *et al.* Immunoregulatory protein B7-H3 promotes growth and decreases sensitivity to therapy in metastatic melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* **30**, 467–476 (2017).

232. Jiang, B., Liu, F., Liu, Z. H., Zhang, T. & Hua, D. B7-H3 increases thymidylate synthase expression via the PI3k-Akt pathway. *Tumor Biol.* **37**, 9465–9472 (2016).
233. Zhang, P., Chen, Z., Ning, K., Jin, J. & Han, X. Inhibition of B7-H3 reverses oxaliplatin resistance in human colorectal cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **490**, 1132–1138 (2017).
234. Ishibashi, M. *et al.* Myeloma Drug Resistance Induced by Binding of Myeloma B7-H1 (PD-L1) to PD-1. *Cancer Immunol. Res.* **4**, 779–88 (2016).
235. Abdelsalam, M. Doxorubicin translocation B7-H1 from the cell surface to the nucleus of breast cancer cells: a novel role for B7-H1 as an anti-apoptotic molecule. *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.* **3**, 163 (2010).
236. Ghebeh, H. *et al.* Doxorubicin downregulates cell surface B7-H1 expression and upregulates its nuclear expression in breast cancer cells: role of B7-H1 as an anti-apoptotic molecule. *Breast Cancer Res.* **12**, R48 (2010).
237. Zhao, X. *et al.* B7-H3 overexpression in pancreatic cancer promotes tumor progression. *Int. J. Mol. Med.* **31**, 283–291 (2013).
238. Chen, Y.-W., Tekle, C. & Fodstad, O. The immunoregulatory protein human B7H3 is a tumor-associated antigen that regulates tumor cell migration and invasion. *Curr. Cancer Drug Targets* **8**, 404–413 (2008).
239. Tekle, C. *et al.* B7-H3 contributes to the metastatic capacity of melanoma cells by modulation of known metastasis-associated genes. *Int. J. Cancer* **130**, 2282–2290 (2012).
240. Li, Y. *et al.* B7-H3 promotes the migration and invasion of human bladder cancer cells via the PI3K/Akt/STAT3 Signaling pathway. *J. Cancer* **8**, 816–824 (2017).
241. Liu, F., Zhang, T., Zou, S., Jiang, B. & Hua, D. B7-H3 promotes cell migration and invasion through the Jak2/Stat3/MMP9 signaling pathway in colorectal cancer. *Mol. Med. Rep.* **12**, 5455–5460 (2015).
242. Xie, C. *et al.* Soluble B7-H3 promotes the invasion and metastasis of pancreatic carcinoma cells through the TLR4/NF- κ B pathway. *Sci. Rep.* **6**, 27528 (2016).
243. Peng, H. *et al.* Role of B7-H4 siRNA in Proliferation, Migration and Invasion of LOVO Colorectal Carcinoma Cell Line. *Biomarkers* **2015**, (2015).
244. Cheng, L. *et al.* B7-H4 expression promotes tumorigenesis in ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* **19**, 1481–6 (2009).
245. Kang, F.-B. *et al.* B7-H3 promotes aggression and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting epithelial-to-mesenchymal transition via JAK2/STAT3/Slug signaling pathway. *Cancer Cell Int.* **15**, 45 (2015).
246. Jiang, B. *et al.* The co-stimulatory molecule B7-H3 promotes the epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Oncotarget* **7**, (2016).
247. Cao, Y. *et al.* Immunoregulatory molecule B7-H1 (CD274) contributes to skin carcinogenesis. *Cancer Res.* **71**, 4737–4741 (2011).
248. Lim, S. *et al.* Immunoregulatory protein B7-H3 reprograms glucose metabolism in cancer cells by ROS-mediated stabilization of HIF1 α . *Cancer Res.* **76**, 2231–2242 (2016).
249. Luo, D. *et al.* B7-H3 regulates lipid metabolism of lung cancer through SREBP1-mediated expression of FASN. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **482**, 1246–1251 (2017).
250. Kim, H. K. *et al.* B7-H4 downregulation induces mitochondrial dysfunction and enhances doxorubicin sensitivity via the cAMP/CREB/PGC1- α signaling pathway in HeLa cells. *Pflugers Arch.* **466**, 2323–2338 (2014).
251. Wu, F., Wang, J. & Ke, X. Knockdown of B7-H6 inhibits tumor progression and enhances chemosensitivity in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Oncol.* **48**, 1561–1570 (2016).
252. Jiang, T., Wu, W., Zhang, H., Zhang, X. & Zhang, D. High expression of B7-H6 in human glioma tissues promotes tumor progression. *Oncotarget* **8**, 37435–37447 (2017).
253. Bedognetti, D., Maccalli, C., Al Bader, S. B. J., Marincola, F. M. & Seliger, B.

- Checkpoint Inhibitors and Their Application in Breast Cancer. *Breast Care* **11**, 108–115 (2016).
254. Monnot, G. C. & Romero, P. Rationale for immunological approaches to breast cancer therapy. *Breast* **37**, 187–195 (2018).
255. Goldhirsch, A. *et al.* Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013. *Ann. Oncol.* **24**, 2206–2223 (2013).
256. Sorlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS* **98**, 10869–10874 (2001).
257. Ahn, S. G., Kim, S. J., Kim, C. & Jeong, J. Molecular Classification of Triple-Negative Breast Cancer. *J. Breast Cancer* **19**, 223 (2016).
258. Solinas, C. *et al.* Targeting immune checkpoints in breast cancer: an update of early results. *ESMO Open* **2**, e000255 (2017).
259. Ghebeh, H. *et al.* The B7-H1 (PD-L1) T Lymphocyte-Inhibitory Molecule Is Expressed in Breast Cancer Patients with Infiltrating Ductal Carcinoma: Correlation with Important High-Risk Prognostic Factors. *Neoplasia* **8**, 190–198 (2006).
260. Wang, M. *et al.* Mechanism of immune evasion in breast cancer. *Onco. Targets. Ther.* 1561–1573 (2017).
261. Alsaab, H. O. *et al.* PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome. *Front. Pharmacol.* **8**, 1–15 (2017).
262. Pavlova, N. N. & Thompson, C. B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* **23**, 27–47 (2016).
263. Warburg, O., Wind, F. & Negelein, E. The Metabolism of Tumors in the Body. *J. Gen. Physiol.* **8**, 519–530 (1927).
264. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science (80-.)*. **324**, 1029–1033 (2009).
265. Cairns, R. A. & Mak, T. W. The current state of cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 613–614 (2016).
266. Warburg, O. Injuring of Respiration the Origin of Cancer Cells. *Science (80-.)*. **123**, 309–14 (1956).
267. Cantor, J. R. & Sabatini, D. M. Cancer cell metabolism: One hallmark, many faces. *Cancer Discov.* **2**, 881–898 (2012).
268. Vander Heiden, M. G. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 671–684 (2011).
269. Hay, N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nat. Rev. Cancer* **16**, 1–15 (2016).
270. DeBerardinis, R. J. *et al.* Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *PNAS* **104**, 19345–19350 (2007).
271. Sun, R. C. & Denko, N. C. Hypoxic regulation of glutamine metabolism through HIF1 and SIAH2 supports lipid synthesis that is necessary for tumor growth. *Cell Metab.* **19**, 285–292 (2014).
272. Yuneva, M. O. *et al.* The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. *Cell Metab.* **15**, 157–170 (2012).
273. Rodrigues, M. F. *et al.* Enhanced OXPHOS, glutaminolysis and β -oxidation constitute the metastatic phenotype of melanoma cells. *Biochem. J.* **473**, 703–15 (2016).
274. Mullen, A. R. *et al.* Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature* **481**, 385–388 (2011).
275. Phannasil, P. *et al.* Pyruvate carboxylase is up-regulated in breast cancer and essential to support growth and invasion of MDA-MB-231 cells. *PLoS One* **10**, 1–20 (2015).
276. Cardaci, S. *et al.* Pyruvate carboxylation enables growth of SDH-deficient cells by supporting aspartate biosynthesis. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1–6 (2015).
277. Rysman, E. *et al.* De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and

- chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer Res.* **70**, 8117–8126 (2010).
278. Zhu, X.-S. *et al.* Attenuation of enoyl coenzyme A hydratase short chain 1 expression in gastric cancer cells inhibits cell proliferation and migration in vitro. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **19**, (2014).
279. Rodríguez-Enríquez, S. *et al.* Mitochondrial free fatty acid β -oxidation supports oxidative phosphorylation and proliferation in cancer cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **65**, 209–221 (2015).
280. Marchetti, P., Guerreschi, P., Mortier, L. & Kluza, J. Integration of Mitochondrial Targeting for Molecular Cancer Therapeutics. *Int. J. Cell Biol.* **2015**, (2015).
281. Hanahan, D. & Coussens, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* **21**, 309–322 (2012).
282. Sonveaux, P. *et al.* Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis. *PLoS One* **7**, (2012).
283. Végran, F., Boidot, R., Michiels, C., Sonveaux, P. & Feron, O. Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF- κ B/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis. *Cancer Res.* **71**, 2550–2560 (2011).
284. Martínez-Zaguilán, R. *et al.* Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* **14**, 176–86 (1996).
285. Rothberg, J. M. *et al.* Acid-Mediated Tumor Proteolysis: Contribution of Cysteine Cathepsins. *Neoplasia* **15**, 1125-IN9 (2013).
286. Stern, R., Shuster, S., Neudecker, B. A. & Formby, B. Lactate Stimulates Fibroblast Expression of Hyaluronan and CD44: The Warburg Effect Revisited. *Exp. Cell Res.* **276**, 24–31 (2002).
287. Fischer, K. *et al.* Inhibitory Effect of Tumor Cell-Derived Lactic Acid on Human T Cells. *Blood* **109**, 3812–3820 (2007).
288. Goetze, K., Walenta, S., Ksiazkiewicz, M., Kunz-Schughart, L. A. & Mueller-Klieser, W. Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release. *Int. J. Oncol.* **39**, 453–463 (2011).
289. Gottfried, E. *et al.* Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Differentiation* **107**, 2013–2021 (2013).
290. Colegio, O. R. *et al.* Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* **513**, 559–563 (2014).
291. Jose, C., Bellance, N. & Rossignol, R. Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: A tumor's dilemma? *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1807**, 552–561 (2011).
292. Cheng, T. *et al.* Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 8674–8679 (2011).
293. Lakhter, A. J. *et al.* Glucose-independent acetate metabolism promotes melanoma cell survival and tumor growth. *J. Biol. Chem.* **291**, 21869–21879 (2016).
294. Nakajima, E. C. & Van Houten, B. Metabolic symbiosis in cancer: Refocusing the Warburg lens. *Mol. Carcinog.* **52**, 329–337 (2013).
295. Young, R. M. *et al.* Dysregulated mTORC1 renders cells critically dependent on desaturated lipids for survival under tumor-like stress. *Genes Dev.* **27**, 1115–1131 (2013).
296. Kamphorst, J. J. *et al.* Hypoxic and Ras-transformed cells support growth by scavenging unsaturated fatty acids from lysophospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 8882–8887 (2013).
297. DeBerardinis, R. J. & Chandel, N. S. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci. Adv.* **2**, e1600200–e1600200 (2016).
298. Chiarugi, P. & Cirri, P. Metabolic exchanges within tumor microenvironment. *Cancer Lett.* **380**, 272–280 (2016).
299. Tardito, S. *et al.* Glutamine synthetase activity fuels nucleotide biosynthesis and supports growth of glutamine-restricted glioblastoma. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1556–1568 (2015).

[Références]

300. Palm, W. & Thompson, C. B. Nutrient acquisition strategies of mammalian cells. *Nat. Publ. Gr.* **546**, 234–242 (2017).
301. Vander Heiden, M. G. & DeBerardinis, R. J. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell* **168**, 657–669 (2017).
302. Degenhardt, K. *et al.* Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* **10**, 51–64 (2006).
303. Strohecker, A. M. *et al.* Autophagy Sustains Mitochondrial Glutamine Metabolism and Growth of BrafV600E-Driven Lung Tumors. *Cancer Discov.* **3**, 1272–1285 (2013).
304. Kohn, A. D., Summers, S. A., Birnbaum, M. J. & Roth, R. A. Expression of a Constitutively Active Akt Ser/Thr Kinase in 3T3-L1 Adipocytes Stimulates Glucose Uptake and Glucose Transporter 4 Translocation. *J. Biol. Chem.* **271**, 31372–31378 (1996).
305. Ward, P. S. & Thompson, C. B. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell* **21**, 297–308 (2012).
306. DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G. & Thompson, C. B. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab.* **7**, 11–20 (2008).
307. Liang, H. *et al.* PTENa, a PTEN isoform translated through alternative initiation, regulates mitochondrial function and energy metabolism. *Cell Metab.* **19**, 836–848 (2014).
308. Cunningham, J. T. *et al.* mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1–PGC-1 α transcriptional complex. *Nature* **450**, 736–740 (2007).
309. Kishton, R. J. *et al.* AMPK is essential to balance glycolysis and mitochondrial metabolism to control T-ALL cell stress and survival. *Cell Metab.* **23**, 649–662 (2016).
310. Cairns, R. A., Harris, I. S. & Mak, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 85–95 (2011).
311. Tennakoon, J. B. *et al.* Androgens regulate prostate cancer cell growth via an AMPK-PGC-1 α -mediated metabolic switch. *Oncogene* **33**, 5251–5261 (2014).
312. Zeng, Q. *et al.* LKB1 inhibits HPV-associated cancer progression by targeting cellular metabolism. *Oncogene* **36**, 1245–1255 (2017).
313. Kluza, J. *et al.* Inactivation of the HIF-1 α /PDK3 signaling axis drives melanoma toward mitochondrial oxidative metabolism and potentiates the therapeutic activity of pro-oxidants. *Cancer Res.* **72**, 5035–5047 (2012).
314. Koch, A. *et al.* Glucose transporter isoform 1 expression enhances metastasis of malignant melanoma cells. *Oncotarget* **6**, 32748–32760 (2015).
315. Gordan, J. D., Thompson, C. B. & Simon, M. C. HIF and c-Myc: Sibling Rivals for Control of Cancer Cell Metabolism and Proliferation. *Cancer Cell* **12**, 108–113 (2007).
316. Bertout, J. A., Patel, S. A. & Simon, M. C. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 967–75 (2008).
317. Nakazawa, M. S., Keith, B. & Simon, M. C. Oxygen availability and metabolic adaptations. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 663–73 (2016).
318. Soussi, T. & Wiman, K. G. TP53: an oncogene in disguise. *Cell Death Differ.* **22**, 1239–1249 (2015).
319. Wang, X., Simpson, E. R. & Brown, K. a. p53: Protection against Tumor Growth beyond Effects on Cell Cycle and Apoptosis. *Cancer Res.* 5001–5008 (2015). doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0563
320. Green, D. R. & Chipuk, J. E. p53 and Metabolism: Inside the TIGAR. *Cell* **126**, 30–32 (2006).
321. Suzuki, S. *et al.* Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 7461–7466 (2010).
322. Jiang, P. *et al.* p53 Regulates Biosynthesis Through Direct Inactivation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *Nat. Cell Biol.* **13**, 310–316 (2011).
323. Kollareddy, M. *et al.* Regulation of nucleotide metabolism by mutant p53 contributes to its gain-of-function activities. *Nat. Commun.* **6**, 7389 (2015).

[Références]

324. Liu, W. & Phang, J. M. Proline dehydrogenase (oxidase) in cancer. *BioFactors* **38**, 398–406 (2012).
325. Mathupala, S. P., Ko, Y. H. & Pedersen, P. L. Hexokinase-2 bound to mitochondria: Cancer's stygian link to the 'Warburg effect' and a pivotal target for effective therapy. *Semin. Cancer Biol.* **19**, 17–24 (2009).
326. Lu, J., Tan, M. & Cai, Q. The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Lett.* **356**, 156–164 (2014).
327. Luo, W. *et al.* Pyruvate Kinase M2 is a PHD3-Stimulated Coactivator for Hypoxia-Inducible Factor 1. *Cell* **145**, 732–744 (2011).
328. Gao, X., Wang, H., Yang, J. J., Liu, X. & Liu, Z. R. Pyruvate Kinase M2 Regulates Gene Transcription by Acting as a Protein Kinase. *Mol. Cell* **45**, 598–609 (2012).
329. Jeoung, N. H. Pyruvate dehydrogenase kinases: Therapeutic targets for diabetes and cancers. *Diabetes Metab. J.* **39**, 188–197 (2015).
330. Zhang, S., Hulver, M. W., McMillan, R. P., Cline, M. A. & Gilbert, E. R. The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility. *Nutr. Metab. (Lond)*. **11**, 10 (2014).
331. Sullivan, L. B., Gui, D. Y. & Vander Heiden, M. G. Altered metabolite levels in cancer: implications for tumour biology and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 680–693 (2016).
332. Lee, N., Kim, D., Kim, and D. & Kim, D. Cancer Metabolism: Fueling More than Just Growth. *Mol. Cells* **39**, 847–854 (2016).
333. Parker, S. J. & Metallo, C. M. Metabolic consequences of oncogenic IDH mutations. *Pharmacol. Ther.* **152**, 54–62 (2015).
334. Sullivan, L. B. & Chandel, N. S. Mitochondrial metabolism in TCA cycle mutant cancer cells. *Cell Cycle* **13**, 347–348 (2014).
335. Sosa, V. *et al.* Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Res. Rev.* **12**, 376–390 (2013).
336. Fiaschi, T. & Chiarugi, P. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: A diabolic liaison. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, (2012).
337. Liou, M.-Y. & Storz, P. *Reactive oxygen species in cancer.* *Free Radic Res.* **44**, (2010).
338. Finkel, T. & Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239–247 (2000).
339. Galadari, S., Rahman, A., Pallichankandy, S. & Thayyullathil, F. Reactive oxygen species and cancer paradox: to promote or to suppress? *Free Radic. Biol. Med.* **104**, 144–164 (2017).
340. Phaniendra, A., Jestadi, D. B. & Periyasamy, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* **30**, 11–26 (2015).
341. Wellen, K. E. & Thompson, C. B. Cellular Metabolic Stress: Considering How Cells Respond to Nutrient Excess. *Mol. Cell* **40**, 323–332 (2010).
342. Martínez-Reyes, I. & Cuezva, J. M. The H⁺-ATP synthase: A gate to ROS-mediated cell death or cell survival. *Biochim. Biophys. Acta* **1837**, 1099–1112 (2014).
343. Wu, J. B. *et al.* Monoamine oxidase A mediates prostate tumorigenesis and cancer metastasis. *J. Clin. Invest.* **124**, 2891–2908 (2014).
344. Pelicano, H., Carney, D. & Huang, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist. Updat.* **7**, 97–110 (2004).
345. Hecht, F. *et al.* The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. *Tumor Biol.* **37**, 4281–4291 (2016).
346. Meitzler, J. L. *et al.* NADPH Oxidases: A Perspective on Reactive Oxygen Species Production in Tumor Biology. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 2873–2889 (2014).
347. Fukuyama, M. *et al.* Overexpression of a novel superoxide-producing enzyme, NADPH oxidase 1, in adenoma and well differentiated adenocarcinoma of the human colon. *Cancer Lett.* **221**, 97–104 (2005).
348. Brar, S. S. *et al.* An NAD(P)H oxidase regulates growth and transcription in melanoma

- cells. *Am. J. Physiol. Physiol.* **282**, C1212–C1224 (2002).
349. Fitzgerald, J. P. *et al.* Nox4 mediates renal cell carcinoma cell invasion through hypoxia-induced interleukin 6- and 8- production. *PLoS One* **7**, 1–9 (2012).
350. Schneider, C. & Pozzi, A. Cyclooxygenases and lipoxygenases in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **30**, 277–294 (2011).
351. Yang, Y. *et al.* Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. *J. Cell. Physiol.* **231**, 2570–2581 (2016).
352. Gorrini, C., Harris, I. S. & Mak, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 931–947 (2013).
353. Lim, S. O. *et al.* Epigenetic Changes Induced by Reactive Oxygen Species in Hepatocellular Carcinoma: Methylation of the E-cadherin Promoter. *Gastroenterology* **135**, 2128–2140 (2008).
354. Sarsour, E. H., Venkataraman, S., Kalen, A. L., Oberley, L. W. & Goswami, P. C. Manganese superoxide dismutase activity regulates transitions between quiescent and proliferative growth. *Aging Cell* **7**, 405–417 (2008).
355. Wang, M. *et al.* Manganese superoxide dismutase suppresses hypoxic induction of hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor. *Oncogene* **24**, 8154–8166 (2005).
356. Felty, Q., Singh, K. P. & Roy, D. Estrogen-induced G1/S transition of G0-arrested estrogen-dependent breast cancer cells is regulated by mitochondrial oxidant signaling. *Oncogene* **24**, 4883–4893 (2005).
357. Menon, S. G., Coleman, M. C., Walsh, S. a, Spitz, D. R. & Goswami, P. C. Differential susceptibility of nonmalignant human breast epithelial cells and breast cancer cells to thiol antioxidant-induced G(1)-delay. *Antioxid. Redox Signal.* **7**, 711–8 (2005).
358. Cullen, J. J. *et al.* The Role of Manganese Superoxide Dismutase in the Growth of Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Res.* **3**, 1297–1303 (2003).
359. Cadenas, E. Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol. Aspects Med.* **25**, 17–26 (2004).
360. Costantini, P. *et al.* Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis. *Oncogene* **19**, 307–314 (2000).
361. Brunet, A. *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857–868 (1999).
362. You, H., Yamamoto, K. & Mak, T. W. Regulation of transactivation-independent proapoptotic activity of p53 by FOXO3a. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 9051–9056 (2006).
363. Schulze-Osthoff, K., Beyaert, R., Vandevoorde, V., Haegeman, G. & Fiers, W. Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF. *EMBO J.* **12**, 3095–104 (1993).
364. Storz, P., Döppler, H., Ferran, C., Grey, S. T. & Toker, A. Functional dichotomy of A20 in apoptotic and necrotic cell death. *Biochem. J.* **387**, 47–55 (2005).
365. Pastorino, J. G., Tafani, M. & Farber, J. L. Tumor necrosis factor induces phosphorylation and translocation of BAD through a phosphatidylinositide-3-OH kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 19411–19416 (1999).
366. Xin, M. & Deng, X. Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **280**, 10781–10789 (2005).
367. Kawamura, N. *et al.* Akt1 in osteoblasts and osteoclasts controls bone remodeling. *PLoS One* **2**, (2007).
368. Kaplon, J. *et al.* A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature* **498**, 109–112 (2013).
369. de Groof, A. J. C. *et al.* Increased OXPHOS activity precedes rise in glycolytic rate in H-RasV12/ E1A transformed fibroblasts that develop a Warburg phenotype. *Mol. Cancer* **8**, 1–14 (2009).
370. Maciag, A., Sithanandam, G. & Anderson, L. M. Mutant K-rasV12 increases COX-2, peroxides and DNA damage in lung cells. *Carcinogenesis* **25**, 2231–2237 (2004).
371. Ambudkar, S. V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z. E. & Gottesman, M. M. P-glycoprotein:

- From genomics to mechanism. *Oncogene* **22**, 7468–7485 (2003).
372. Ledoux, S., Yang, R. & Friedlander, G. Glucose Depletion Enhances P-Glycoprotein Expression in Hepatoma Cells: Role of Endoplasmic Reticulum Stress Response 1. *Cancer Res.* **63**, 7284–7290 (2003).
373. Terada, Y. *et al.* Intestinal P-glycoprotein expression is multimodally regulated by intestinal ischemia-reperfusion. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **17**, 266–276 (2014).
374. Li, L., Xu, J., Min, T. & Huang, W. Up-regulation of P-glycoprotein expression by catalase via JNK activation in HepG2 cells. *Redox Rep* **11**, 173–178 (2006).
375. Tochwang, L., Deng, S., Pervaiz, S. & Yap, C. T. Redox regulation of cancer cell migration and invasion. *Mitochondrion* **13**, 246–253 (2013).
376. Hempel, N., Bartling, T. R., Mian, B. & Melendez, J. A. Acquisition of the Metastatic Phenotype Is Accompanied by H₂O₂-Dependent Activation of the p130Cas Signaling Complex. *Mol. Cancer Res.* **11**, 303–312 (2013).
377. Hitchler, M. J., Oberley, L. W. & Domann, F. E. Epigenetic silencing of SOD2 by histone modifications in human breast cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 1573–1580 (2008).
378. Hitchler, M. J. *et al.* Epigenetic regulation of manganese superoxide dismutase expression in human breast cancer cells. *Epigenetics* **1**, 163–171 (2006).
379. Wang, C., Harrell, J., Iwanaga, R., Jedlicka, P. & Ford, H. L. Vascular endothelial growth factor-C promotes breast cancer progression via a novel anti-oxidant mechanism that involves regulation of Superoxide dismutase 3. *Breast Cancer Res.* **16**, 462 (2014).
380. Chen, X., Zhang, Q., Zhao, R. & Ding, X. Rac1 and superoxide are required for the expression of cell adhesion molecules induced by tumor necrosis factor- α in endothelial cells. ... *Pharmacol. ...* **305**, 573–580 (2003).
381. Lee, K. H., Kim, S. W. & Kim, J.-R. Reactive oxygen species regulate urokinase plasminogen activator expression and cell invasion via mitogen-activated protein kinase pathways after treatment with hepatocyte growth factor in stomach cancer cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **28**, 73 (2009).
382. Werner, E. & Werb, Z. Integrins engage mitochondrial function for signal transduction by a mechanism dependent on Rho GTPases. *J. Cell Biol.* **158**, 357–368 (2002).
383. Goldkorn, T. *et al.* EGF-Receptor Phosphorylation and Signaling Are Targeted by H₂O₂ Redox Stress. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **19**, 786–798 (1998).
384. Liu, L. Z. *et al.* Reactive oxygen species regulate epidermal growth factor-induced vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 α expression through activation of AKT and P70S6K1 in human ovarian cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.* **41**, 1521–1533 (2006).
385. Alexandrova, A. Y., Kopnin, P. B., Vasiliev, J. M. & Kopnin, B. P. ROS up-regulation mediates Ras-induced changes of cell morphology and motility. *Exp. Cell Res.* **312**, 2066–2073 (2006).
386. Liu, F., Gomez Garcia, A. M. & Meyskens, F. L. NADPH oxidase 1 overexpression enhances invasion via matrix metalloproteinase-2 and epithelial-mesenchymal transition in melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 2033–2041 (2012).
387. Lin, T., Cantley, L. C. & DeNicola, G. M. NRF2 Rewires Cellular Metabolism to Support the Antioxidant Response. *Intech open Sci.* 21–48 (2016).
388. Baty, J. W., Hampton, M. B. & Winterbourn, C. C. Proteomic detection of hydrogen peroxide-sensitive thiol proteins in Jurkat cells. *Biochem. J.* **389**, 785–95 (2005).
389. Ralser, M. *et al.* Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *J. Biol.* **6**, (2007).
390. Hwang, N. R. *et al.* Oxidative modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase play a key role in its multiple cellular functions. *Biochem. J.* **423**, 253–264 (2009).
391. Anastasiou, D. Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive Oxygen Species contributes to cellular Antioxydant responses. *Science (80-)*. **334**, 1278–1283 (2011).

392. Kung, C. *et al.* Small molecule activation of pkm2 in cancer cells induces serine auxotrophy. *Chem. Biol.* **19**, 1187–1198 (2012).
393. DeNicola, G. M. *et al.* NRF2 regulates serine biosynthesis in non-small cell lung cancer. *Nat. Genet.* **47**, 1475–1481 (2015).
394. Maddocks, O. D. K. *et al.* Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature* **493**, 542–546 (2013).
395. Cheung, E. C. *et al.* Opposing effects of TIGAR- and RAC1-derived ROS on Wnt-driven proliferation in the mouse intestine. *Genes Dev.* **30**, 52–63 (2016).
396. Bensaad, K. *et al.* TIGAR, a p53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis. *Cell* **126**, 107–120 (2006).
397. Bensaad, K. & Vousden, K. H. P53: New Roles in Metabolism. *Trends Cell Biol.* **17**, 286–291 (2007).
398. Li, H. & Jogl, G. Structural and biochemical studies of TIGAR (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator). *J. Biol. Chem.* **284**, 1748–1754 (2009).
399. Wanka, C., Steinbach, J. P. & Rieger, J. Tp53-induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR) protects glioma cells from starvation-induced cell death by up-regulating respiration and improving cellular redox homeostasis. *J. Biol. Chem.* **287**, 33436–33446 (2012).
400. Cheung, E. C., Ludwig, R. L. & Vousden, K. H. Mitochondrial localization of TIGAR under hypoxia stimulates HK2 and lowers ROS and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 20491–20496 (2012).
401. Mailloux, R. J., Jin, X. & Willmore, W. G. Redox regulation of mitochondrial function with emphasis on cysteine oxidation reactions. *Redox Biol.* **2**, 123–139 (2014).
402. Dewhirst, M. W., Cao, Y. & Moeller, B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 425–37 (2008).
403. Pani, G., Giannoni, E., Galeotti, T. & Chiarugi, P. Redox-based escape mechanism from death: the cancer lesson. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 2791–2806 (2009).
404. Dang, C. V. & Semenza, G. L. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 68–72 (1999).
405. Bothorel, P. Implication du stress oxydant dans la biologie tumorale. *Thèse* (2011).
406. Manning, B. D. & Cantley, L. C. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* **129**, 1261–1274 (2007).
407. Fruehauf, J. P. & Meyskens, F. L. Reactive oxygen species: A breath of life or death? *Clin. Cancer Res.* **13**, 789–794 (2007).
408. Fukuda, R. *et al.* HIF-1 Regulates Cytochrome Oxidase Subunits to Optimize Efficiency of Respiration in Hypoxic Cells. *Cell* **129**, 111–122 (2007).
409. Potente, M., Gerhardt, H. & Carmeliet, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* **146**, 873–887 (2011).
410. Xia, C. *et al.* Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* **67**, 10823–10830 (2007).
411. Jing, Y. *et al.* Cadmium increases HIF-1 and VEGF expression through ROS, ERK, and AKT signaling pathways and induces malignant transformation of human bronchial epithelial cells. *Toxicol. Sci.* **125**, 10–19 (2012).
412. Sullivan, L. B. & Chandel, N. S. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab.* **2**, 17 (2014).
413. Kaludercic, N., Deshwal, S. & Di Lisa, F. Reactive oxygen species and redox compartmentalization. *Front. Physiol.* **5 JUL**, 1–15 (2014).
414. Board, P. G. & Menon, D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 3267–3288 (2013).
415. Sabharwal, S. S. & Schumacker, P. T. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat. Rev. Cancer* **14**, 709–721 (2014).
416. Panieri, E. & Santoro, M. M. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis.* **7**, e2253 (2016).
417. Taguchi, K. & Yamamoto, M. The KEAP1–NRF2 System in Cancer. *Front. Oncol.* **7**, 1–11 (2017).

[Références]

418. Pandey, P. *et al.* The see-saw of Keap1-Nrf2 pathway in cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **116**, 89–98 (2017).
419. Leinonen, H. M., Kansanen, E., Pölönen, P., Heinäniemi, M. & Levonen, A.-L. Dysregulation of the Keap1–Nrf2 pathway in cancer. *Biochem. Soc. Trans.* **43**, 645–649 (2015).
420. Leinonen, H. M., Kansanen, E., Pölönen, P., Heinäniemi, M. & Levonen, A. L. *Role of the keap1-Nrf2 pathway in cancer. Advances in Cancer Research* **122**, (2014).
421. Zhang, Y., Crouch, D. H., Yamamoto, M. & Hayes, J. D. Negative regulation of the Nrf1 transcription factor by its N-terminal domain is independent of Keap1: Nrf1, but not Nrf2, is targeted to the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* **399**, 373–385 (2006).
422. Sankaranarayanan, K. & Jaiswal, A. K. Nrf3 negatively regulates antioxidant-response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *J. Biol. Chem.* **279**, 50810–50817 (2004).
423. Singh, S., Vrishni, S., Singh, B. K., Rahman, I. & Kakkar, P. Nrf2-ARE stress response mechanism: A control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. *Free Radic. Res.* **44**, 1267–1288 (2010).
424. Magesh, S., Chen, Y. & Hu, L. Small Molecule Modulators of Keap1-Nrf2-ARE Pathway as Potential Preventive and Therapeutic Agents. *Med. Res. Rev.* **32**, 687–726 (2012).
425. Ma, Q. & He, X. Molecular Basis of Electrophilic and Oxidative Defense: Promises and Perils of Nrf2. *Pharmacol. Rev.* **64**, 1055–1081 (2012).
426. D'Autréaux, B. & Toledano, M. B. ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 813–824 (2007).
427. Yamamoto, T. *et al.* Physiological Significance of Reactive Cysteine Residues of Keap1 in Determining Nrf2 Activity. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 2758–2770 (2008).
428. Hu, C., Egger, A. L., Mesecar, A. D. & Van Breemen, R. B. Modification of Keap1 cysteine residues by sulforaphane. *Chem. Res. Toxicol.* **24**, 515–521 (2011).
429. Taguchi, K., Motohashi, H. & Yamamoto, M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells* **16**, 123–140 (2011).
430. Rushmore, T. H., Morton, M. R. & Pickett, C. B. The Antioxidant Responsive Element - Activation by Oxidative Stress and Identification of the DNA Consensus Sequence Required for Functional-Activity. *J. Biol. Chem.* **266**, 11632–11639 (1991).
431. Nioi, P., McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M. & Hayes, J. D. Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem. J.* **374**, 337–348 (2003).
432. Andrews, N. C., Erdjument-Bromage, H., Davidson, M. B., Tempst, P. & Orkin, S. H. Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature* **362**, 722–728 (1993).
433. Venugopal, R. & Jaiswal, a K. Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene* **17**, 3145–3156 (1998).
434. He, C. H. *et al.* Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. *J. Biol. Chem.* **276**, 20858–20865 (2001).
435. Itoh, K., Chiba, T., Takashi, S. & Et, A. An Nrf2/small Mad heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 313–322 (1997).
436. Zhu, H., Itoh, K., Yamamoto, M., Zweier, J. L. & Li, Y. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: Protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Lett.* **579**, 3029–3036 (2005).
437. Reisman, S. A., Yeager, R. L., Yamamoto, M. & Klaassen, C. D. Increased Nrf2 activation in livers from keap1-knockdown mice Increases expression of cytoprotective genes that detoxify electrophiles more than those that detoxify reactive oxygen

- species. *Toxicol. Sci.* **108**, 35–47 (2009).
438. Singh, A. *et al.* Glutathione peroxidase 2, the major cigarette smoke-inducible isoform of GPX in lungs, is regulated by Nrf2. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **35**, 639–650 (2006).
439. Tanito, M., Agbaga, M. P. & Anderson, R. E. Upregulation of thioredoxin system via Nrf2-antioxidant responsive element pathway in adaptive-retinal neuroprotection in vivo and in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 1838–1850 (2007).
440. Kim, Y. J. *et al.* Human prx1 gene is a target of Nrf2 and is up-regulated by hypoxia/reoxygenation: Implication to tumor biology. *Cancer Res.* **67**, 546–554 (2007).
441. Lu, S. C. Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 3143–3153 (2013).
442. Macleod, A. K. *et al.* Characterization of the cancer chemopreventive NRF2-dependent gene battery in human keratinocytes: Demonstration that the KEAP1-NRF2 pathway, and not the BACH1-NRF2 pathway, controls cytoprotection against electrophiles as well as redox-cycling compounds. *Carcinogenesis* **30**, 1571–1580 (2009).
443. Gozzelino, R., Jeney, V. & Soares, M. P. Mechanisms of Cell Protection by Heme Oxygenase-1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **50**, 323–354 (2010).
444. Mani, M. *et al.* Homocysteine induces heme oxygenase-1 expression via transcription factor Nrf2 activation in HepG2 cells. *Iran. Biomed. J.* **17**, 93–100 (2013).
445. Ishii, T. *et al.* Transcription Factor Nrf2 Coordinately Regulates a Group of Oxidative Stress-inducible Genes in Macrophages Transcription Factor Nrf2 Coordinately Regulates a Group of Oxidative Stress-inducible Genes in Macrophages. *J. Biol. Chem.* **275**, 16023–16029 (2000).
446. Shin, J.-W. *et al.* Zerumbone induces heme oxygenase-1 expression in mouse skin and cultured murine epidermal cells through activation of Nrf2. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. **4**, 860–870 (2011).
447. Migdal, C. *et al.* Reactivity of chemical sensitizers toward amino acids in Cellulo plays a role in the activation of the Nrf2-ARE pathway in human monocyte dendritic cells and the THP-1 cell line. *Toxicol. Sci.* **133**, 259–274 (2013).
448. Papanikolaou, G. & Pantopoulos, K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **202**, 199–211 (2005).
449. Huang, B. W., Ray, P. D., Iwasaki, K. & Tsuji, Y. Transcriptional regulation of the human ferritin gene by coordinated regulation of Nrf2 and protein arginine methyltransferases PRMT1 and PRMT4. *FASEB J.* **27**, 3763–3774 (2013).
450. Pietsch, E. C., Chan, J. Y., Torti, F. M. & Torti, S. V. Nrf2 mediates the induction of ferritin H in response to xenobiotics and cancer chemopreventive dithiolethiones. *J. Biol. Chem.* **278**, 2361–2369 (2003).
451. Thimmulappa, R. K., Mai, K. H. & Srisuma, S. Identification of Nrf2-regulated Genes Induced by the Chemopreventive Agent Sulforaphane by Oligonucleotide Microarray Identification of Nrf2-regulated Genes Induced by the Chemopreventive Agent. 5196–5203 (2002).
452. Rowland, A., Miners, J. O. & Mackenzie, P. I. The UDP-glucuronosyltransferases: Their role in drug metabolism and detoxification. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 1121–1132 (2013).
453. Siegel, D., Yan, C. & Ross, D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. *Biochem. Pharmacol.* **83**, 1033–1040 (2012).
454. Long II, D. J. *et al.* Advances in Brief NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase 1 Deficiency Increases Susceptibility to Benzo(a)pyrene-induced Mouse Skin Carcinogenesis 1. *Cancer Res.* **60**, 5913–5915 (2000).
455. Iskander, K., Barrios, R. J. & Jaiswal, A. K. Disruption of NAD(P)H:Quinone oxidoreductase 1 gene in mice leads to radiation-induced myeloproliferative disease. *Cancer Res.* **68**, 7915–7922 (2008).
456. Wang, W. & Jaiswal, A. K. Nuclear factor Nrf2 and antioxidant response element regulate NRH:quinone oxidoreductase 2 (NQO2) gene expression and antioxidant

- induction. *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 1119–1130 (2006).
457. Hu, R. *et al.* Gene expression profiles induced by cancer chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in the liver of C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (-/-) mice. *Cancer Lett.* **243**, 170–192 (2006).
458. Yeh, C. & Yen, G. Induction of Hepatic Antioxidant Enzymes by Phenolic Acids in Rats Is Accompanied by Increased Levels of Multidrug Resistance – Associated. *J. Nutr.* **136**, 11–15 (2006).
459. Dallas, S., Miller, D. S. & Bendayan, R. Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system. *Pharmacol. Rev.* **58**, 140–161 (2006).
460. Hayashi, A., Suzuki, H., Itoh, K., Yamamoto, M. & Sugiyama, Y. Transcription factor Nrf2 is required for the constitutive and inducible expression of multidrug resistance-associated protein 1 in mouse embryo fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**, 824–829 (2003).
461. Maher, J. M., Cheng, X., Slitt, A. L., Dieter, M. Z. & Klaassen, C. D. Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver. *Drug Metab. Dispos.* **33**, 956–962 (2005).
462. Jigorel, E., Le Vee, M., Boursier-Neyret, C., Parmentier, Y. & Fardel, O. Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* **34**, 1756–1763 (2006).
463. Thimmulappa, R. K. *et al.* Identification of Nrf2-regulated Genes Induced by the Chemopreventive Agent Sulforaphane by Oligonucleotide Microarray. *Cancer Res.* **62**, 5196–5203 (2002).
464. Kwak, M. K., Wakabayashi, N. & Kensler, T. W. Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **555**, 133–148 (2004).
465. He, X. & Ma, Q. NRF2 Cysteine Residues Are Critical for Oxidant / Electrophile-Ubiquitination-Proteasomal Degradation, and Transcription Activation. *Mol. Pharmacol.* **76**, 1265–1278 (2009).
466. Tong, K. I., Kobayashi, A., Katsuoka, F. & Yamamoto, M. Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: A hinge and latch mechanism. *Biol. Chem.* **387**, 1311–1320 (2006).
467. Tong, K. I. *et al.* Different Electrostatic Potentials Define ETGE and DLG Motifs as Hinge and Latch in Oxidative Stress Response. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7511–7521 (2007).
468. Tong, K. I. *et al.* Keap1 Recruits Neh2 through Binding to ETGE and DLG Motifs: Characterization of the Two-Site Molecular Recognition Model. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2887–2900 (2006).
469. Egger, A. L., Small, E., Hannink, M. & Mesecar, A. D. Cul3-mediated Nrf2 ubiquitination and antioxidant response element (ARE) activation are dependent on the partial molar volume at position 151 of Keap1. *Biochem. J.* **422**, 171–180 (2009).
470. Baird, L., Lleres, D., Swift, S. & Dinkova-Kostova, A. T. Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response is conferred by conformational cycling of the Keap1-Nrf2 protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 15259–15264 (2013).
471. Baird, L., Swift, S., Lleres, D. & Dinkova-Kostova, A. T. Monitoring Keap1-Nrf2 interactions in single live cells. *Biotechnol. Adv.* **32**, 1133–1144 (2014).
472. Li, W., Yu, S. W. & Kong, A. N. T. Nrf2 possesses a redox-sensitive nuclear exporting signal in the Neh5 transactivation domain. *J. Biol. Chem.* **281**, 27251–27263 (2006).
473. Niture, S. K., Kaspar, J. W., Shen, J. & Jaiswal, A. K. Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **244**, 37–42 (2010).
474. Owuor, E. D. & Kong, A. N. T. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem. Pharmacol.* **64**, 765–770 (2002).
475. Sun, Z., Huang, Z. & Zhang, D. D. Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by MAP kinases has a limited contribution in modulating the Nrf2-dependent antioxidant response. *PLoS One* **4**, (2009).

476. Lee, M. S. *et al.* Dieckol enhances the expression of antioxidant and detoxifying enzymes by the activation of Nrf2-MAPK signalling pathway in HepG2 cells. *Food Chem.* **174**, 538–546 (2015).
477. Yu, R. *et al.* Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **275**, 39907–39913 (2000).
478. Apopa, P. L., He, X. & Ma, Q. Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **22**, 63–76 (2008).
479. Salazar, M., Rojo, A. I., Velasco, D., De Sagarra, R. M. & Cuadrado, A. Glycogen synthase kinase-3 β inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *J. Biol. Chem.* **281**, 14841–14851 (2006).
480. Sun, Z., Chin, Y. E. & Zhang, D. D. Acetylation of Nrf2 by p300/CBP Augments Promoter-Specific DNA Binding of Nrf2 during the Antioxidant Response. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 2658–2672 (2009).
481. Kato, Y. *et al.* Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes to Cells* **6**, 857–868 (2001).
482. Kawai, Y., Garduño, L., Theodore, M., Yang, J. & Arinze, I. J. Acetylation-deacetylation of the transcription factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) regulates its transcriptional activity and nucleocytoplasmic localization. *J. Biol. Chem.* **286**, 7629–7640 (2011).
483. Mercado, N. *et al.* Decreased histone deacetylase 2 impairs Nrf2 activation by oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **406**, 292–298 (2011).
484. Hong, F., Sekhar, K. E., Freeman, M. L. & Liebler, D. C. Specific patterns of electrophile adduction trigger Keap1 ubiquitination and Nrf2 activation. *J. Biol. Chem.* **280**, 31768–31775 (2005).
485. Zhang, D. D. *et al.* Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch substrate adaptor protein for Cul3, targets Keap1 for degradation by a proteasome-independent pathway. *J. Biol. Chem.* **280**, 30091–30099 (2005).
486. Azlan, A., Dzaki, N. & Azzam, G. Argonaute: The executor of small RNA function. *J. Genet. Genomics* **43**, 481–494 (2016).
487. Sangokoya, C., Telen, M. J. & Chi, J. T. microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. *Blood* **116**, 4338–4348 (2010).
488. Yang, M., Yao, Y., Eades, G., Zhang, Y. & Zhou, Q. MiR-28 regulates Nrf2 expression through a Keap1-independent mechanism. *Breast Cancer Res. Treat.* **129**, 983–991 (2011).
489. Eades, G., Yang, M., Yao, Y., Zhang, Y. & Zhou, Q. miR-200a regulates Nrf2 activation by targeting Keap1 mRNA in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 40725–40733 (2011).
490. Karin, M. & Greten, F. R. NF- κ B: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 749–759 (2005).
491. Lee, D. F. *et al.* KEAP1 E3 Ligase-Mediated Downregulation of NF- κ B Signaling by Targeting IKK β . *Mol. Cell* **36**, 131–140 (2009).
492. Yu, M. *et al.* Nuclear factor p65 interacts with Keap1 to repress the Nrf2-ARE pathway. *Cell. Signal.* **23**, 883–892 (2011).
493. Copple, I. M. *et al.* Physical and functional interaction of sequestosome 1 with Keap1 regulates the Keap1-Nrf2 cell defense pathway. *J. Biol. Chem.* **285**, 16782–16788 (2010).
494. Komatsu, M. *et al.* The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat. Cell Biol.* **12**, 213–223 (2010).
495. Lau, A. *et al.* A Noncanonical Mechanism of Nrf2 Activation by Autophagy Deficiency:

- Direct Interaction between Keap1 and p62. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 3275–3285 (2010).
496. Jain, A. *et al.* p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J. Biol. Chem.* **285**, 22576–22591 (2010).
497. Sun, Z. *et al.* KPNA6 (Importin 7)-Mediated Nuclear Import of Keap1 Represses the Nrf2-Dependent Antioxidant Response. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 1800–1811 (2011).
498. Lo, S. C. & Hannink, M. PGAM5 tethers a ternary complex containing Keap1 and Nrf2 to mitochondria. *Exp. Cell Res.* **314**, 1789–1803 (2008).
499. Lo, S. C. & Hannink, M. PGAM5, a Bcl-XL-interacting protein, is a novel substrate for the redox-regulated Keap1-dependent ubiquitin ligase complex. *J. Biol. Chem.* **281**, 37893–37903 (2006).
500. Li, W. *et al.* Caveolin-1 inhibits expression of antioxidant enzymes through direct interaction with nuclear erythroid 2 p45-related factor-2 (Nrf2). *J. Biol. Chem.* **287**, 20922–20930 (2012).
501. Volonte, D. *et al.* Inhibition of nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf2) by caveolin-1 promotes stress-induced premature senescence. *Mol. Biol. Cell* **24**, 1852–1862 (2013).
502. Raninga, P. V., Di Trapani, G. & Tonissen, K. F. Cross talk between two antioxidant systems, Thioredoxin and DJ-1: consequences for cancer. *Oncoscience* **1**, (2014).
503. Clements, C. M., McNally, R. S., Conti, B. J., Mak, T. W. & Ting, J. P.-Y. DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 15091–15096 (2006).
504. Im, J. Y., Lee, K. W., Woo, J. M., Junn, E. & Mouradian, M. M. Dj-1 induces thioredoxin 1 expression through the Nrf2 pathway. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 3013–3024 (2012).
505. El-Deiry, W. S. *et al.* WAF1, a Potential Mediator of p53 Tumor Suppression. *Cell* **75**, 817–825 (1993).
506. Pang, L. Y. *et al.* P21WAF1 is component of a positive feedback loop that maintains the p53 transcriptional program. *Cell Cycle* **10**, 932–950 (2011).
507. Rotblat, B., Melino, G. & Knight, R. A. NRF2 and p53: Januses in cancer? *Oncotarget* **3**, 1272–83 (2012).
508. Chen, W. *et al.* Direct Interaction between Nrf2 and p21Cip1/WAF1 Upregulates the Nrf2-Mediated Antioxidant Response. *Mol. Cell* **34**, 663–673 (2009).
509. Kalo, E. *et al.* Mutant p53^{R273H} attenuates the expression of phase 2 detoxifying enzymes and promotes the survival of cells with high levels of reactive oxygen species. *J. Cell Sci.* **125**, 5578–5586 (2012).
510. Asher, G., Tsvetkov, P., Kahana, C. & Shaul, Y. A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73. *Genes Dev.* **1**, 316–321 (2005).
511. Asher, G., Lotem, J., Cohen, B., Sachs, L. & Shaul, Y. Regulation of p53 stability and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 1188–1193 (2001).
512. Tsvetkov, P., Reuven, N. & Shaul, Y. Ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation. *Cell Death Differ.* **17**, 103–108 (2010).
513. Asher, G., Lotem, J., Sachs, L., Kahana, C. & Shaul, Y. Mdm-2 and ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation regulated by NQO1. *PNAS* **99**, 13125–13130 (2002).
514. You, A. *et al.* Transcription factor Nrf2 maintains the basal expression of Mdm2: An implication of the regulation of p53 signaling by Nrf2. *Arch. Biochem. Biophys.* **507**, 356–364 (2011).
515. Faraonio, R. *et al.* p53 suppresses the Nrf2-dependent transcription of antioxidant response genes. *J. Biol. Chem.* **281**, 39776–39784 (2006).
516. Sporn, M. B. & Libby, K. T. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 564–571 (2012).
517. Huang, Y., Li, W., Su, Z. yuan & Kong, A. N. T. The complexity of the Nrf2 pathway: Beyond the antioxidant response. *J. Nutr. Biochem.* **26**, 1401–1413 (2015).

518. Bonay, M. & Deramautd, T. B. Nrf2 : new insight in cell apoptosis. *Cell Death Dis.* **6**, (2015).
519. Xu, C. *et al.* Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced skin tumorigenesis in C57BL/6 mice by sulforaphane is mediated by nuclear factor E2-related factor 2. *Cancer Res.* **66**, 8293–8296 (2006).
520. Ramos-Gomez, M. *et al.* Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 3410–3415 (2001).
521. Keller, U. *et al.* Nrf Transcription Factors in Keratinocytes Are Essential for Skin Tumor Prevention but Not for Wound Healing. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 3773–3784 (2006).
522. Khor, T. O. *et al.* Increased susceptibility of Nrf2 knockout mice to colitis-associated colorectal cancer. *Cancer Prev. Res.* **1**, 187–191 (2008).
523. Padmanabhan, B. *et al.* Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Mol. Cell* **21**, 689–700 (2006).
524. Ohta, T. *et al.* Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Res.* **68**, 1303–1309 (2008).
525. Shibata, T. *et al.* Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 10392–10393 (2009).
526. Stacy, D. R. *et al.* Increased expression of Nuclear Factor E2 p45-related factor 2 (NRF2) in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* **28**, 813–818 (2006).
527. Nioi, P. & Nguyen, T. A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 816–821 (2007).
528. Jiang, T. *et al.* High levels of Nrf2 determine chemoresistance in type II endometrial cancer. *Cancer Res.* **70**, 5486–5496 (2010).
529. Shibata, T. *et al.* Genetic Alteration of Keap1 Confers Constitutive Nrf2 Activation and Resistance to Chemotherapy in Gallbladder Cancer. *Gastroenterology* **135**, 1358–1368 (2008).
530. Schäfer, M. *et al.* Nrf2 establishes a glutathione-mediated gradient of UVB cytoprotection in the epidermis. *Genes Dev.* **24**, 1045–1058 (2010).
531. Wang, X. J. *et al.* Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* **29**, 1235–1243 (2008).
532. Kim, S. K. *et al.* Increased expression of Nrf2/ARE-dependent anti-oxidant proteins in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 537–546 (2008).
533. Kim, H. R. *et al.* Suppression of Nrf2-driven heme oxygenase-1 enhances the chemosensitivity of lung cancer A549 cells toward cisplatin. *Lung Cancer* **60**, 47–56 (2008).
534. Mahaffey, C. M. *et al.* Multidrug-resistant protein-3 gene regulation by the transcription factor Nrf2 in human bronchial epithelial and non-small-cell lung carcinoma. *Free Radic. Biol. Med.* **46**, 1650–1657 (2009).
535. Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M. & Greenwood, M. T. Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 238–59 (2011).
536. Arlt, A. *et al.* Inhibition of the Nrf2 transcription factor by the alkaloid trigonelline renders pancreatic cancer cells more susceptible to apoptosis through decreased proteasomal gene expression and proteasome activity. *Oncogene* **32**, 4825–4835 (2013).
537. Pan, H. *et al.* The involvement of Nrf2-ARE pathway in regulation of apoptosis in human glioblastoma cell U251. *Neurol Res* **35**, 71–78 (2013).
538. Lee, Y., Lee, D. M. & Lee, S. Nrf2 Expression and Apoptosis in Quercetin-treated Malignant Mesothelioma Cells. *Mol. Cells* **38**, 416–425 (2015).
539. Kroemer, G. & Levine, B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1–7 (2008). doi:10.1038/nrm2529
540. Itakura, E. & Mizushima, N. p62 targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. *J. Cell Biol.* **192**, 17–27 (2011).
541. Zhu, L. *et al.* Regulation of Cigarette Smoke (CS)-Induced Autophagy by Nrf2. *PLoS*

- One* **8**, 1–9 (2013).
542. Denicola, G. M. *et al.* Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* **475**, 106–110 (2011).
543. Heiss, E. H., Schachner, D., Zimmermann, K. & Dirsch, V. M. Glucose availability is a decisive factor for Nrf2-mediated gene expression. *Redox Biol.* **1**, 359–365 (2013).
544. Singh, A. *et al.* Transcription factor NRF2 regulates miR-1 and miR-206 to drive tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* **123**, 2921–2934 (2013).
545. Ahmad, F. *et al.* Nrf2-driven TERT regulates pentose phosphate pathway in glioblastoma. *Cell Death Dis.* **7**, (2016).
546. Xu, I. M.-J. *et al.* Transketolase counteracts oxidative stress to drive cancer development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E725–E734 (2016).
547. Mitsuishi, Y. *et al.* Nrf2 Redirects Glucose and Glutamine into Anabolic Pathways in Metabolic Reprogramming. *Cancer Cell* **22**, 66–79 (2012).
548. Locasale, J. W. *et al.* Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat. Genet.* **43**, 869–874 (2011).
549. Wu, K. C., Cui, J. Y. & Klaassen, C. D. Effect of graded nrf2 activation on phase-I and -II drug metabolizing enzymes and transporters in mouse liver. *PLoS One* **7**, (2012).
550. Hirotsu, Y. *et al.* Nrf2-MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks. *Nucleic Acids Res.* **40**, 10228–10239 (2012).
551. Averous, J. *et al.* Induction of CHOP Expression by Amino Acid Limitation Requires Both ATF4 Expression and ATF2 Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **279**, 5288–5297 (2004).
552. Agyeman, A. S. *et al.* Transcriptomic and proteomic profiling of KEAP1 disrupted and sulforaphane-treated human breast epithelial cells reveals common expression profiles. *Breast Cancer Res. Treat.* **132**, 175–187 (2012).
553. Wu, K. C., Cui, J. Y. & Klaassen, C. D. Beneficial role of Nrf2 in regulating NADPH generation and consumption. *Toxicol. Sci.* **123**, 590–600 (2011).
554. Meakin, P. J. *et al.* Susceptibility of Nrf2-Null Mice to Steatohepatitis and Cirrhosis upon Consumption of a High-Fat Diet Is Associated with Oxidative Stress, Perturbation of the Unfolded Protein Response, and Disturbance in the Expression of Metabolic Enzymes but Not with I. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 3305–3320 (2014).
555. Slocum, S. L. *et al.* Keap1/Nrf2 pathway activation leads to a repressed hepatic gluconeogenic and lipogenic program in mice on a high-fat diet. *Arch. Biochem. Biophys.* **591**, 57–65 (2016).
556. Pang, S., Lynn, D. A., Lo, J. Y., Paek, J. & Curran, S. P. SKN-1 and Nrf2 couples proline catabolism with lipid metabolism during nutrient deprivation. *Nat. Commun.* **5**, 1–8 (2015).
557. Pike, L. S., Smift, A. L., Croteau, N. J., Ferrick, D. A. & Wu, M. Inhibition of fatty acid oxidation by etomoxir impairs NADPH production and increases reactive oxygen species resulting in ATP depletion and cell death in human glioblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1807**, 726–731 (2011).
558. Kao, K. J., Chang, K. M., Hsu, H. C. & Huang, A. T. Correlation of microarray-based breast cancer molecular subtypes and clinical outcomes: implications for treatment optimization. *BMC Cancer* **11**, 143 (2011).
559. Sabatier, R. *et al.* A gene expression signature identifies two prognostic subgroups of basal breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **126**, 407–420 (2011).
560. Maire, V. *et al.* TTK/hMPS1 Is an Attractive Therapeutic Target for Triple-Negative Breast Cancer. *PLoS One* **8**, (2013).
561. Higashimoto, Y. *et al.* Human p53 is phosphorylated on serines 6 and 9 in response to DNA damage-inducing agents. *J. Biol. Chem.* **275**, 23199–23203 (2000).
562. Leroy, B. *et al.* Analysis of TP53 Mutation Status in Human Cancer Cell Lines: A Reassessment. *Hum. Mutat.* **35**, 756–765 (2014).
563. Kruiswijk, F., Labuschagne, C. F. & Vousden, K. H. P53 in Survival, Death and Metabolic Health: a Lifeguard With a Licence To Kill. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 393–405 (2015).

564. Wu, C. L., Zukerberg, L. R., Ngwu, C., Harlow, E. & Lees, J. A. In vivo association of E2F and DP family proteins. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2536–46 (1995).
565. Boulton, S. J. & Jackson, S. P. Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *EMBO J.* **17**, 1819–1828 (1998).
566. Moldovan, G. L., Pfander, B. & Jentsch, S. PCNA, the Maestro of the Replication Fork. *Cell* **129**, 665–679 (2007).
567. Pal, T., Permut-Wey, J. & Sellers, T. A. A review of the clinical relevance of mismatch-repair deficiency in ovarian cancer. *Cancer* **113**, 733–742 (2008).
568. McNeely, S., Beckmann, R. & Bence Lin, A. K. CHEK again: Revisiting the development of CHK1 inhibitors for cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* **142**, 1–10 (2014).
569. Dittrich, A., Hessenkemper, W. & Schaper, F. Systems biology of IL-6, IL-12 family cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* **26**, 595–602 (2015).
570. Vlaming, M. L. H., Lagas, J. S. & Schinkel, A. H. Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): Recent findings in Abcg2 knockout mice. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 14–25 (2009).
571. Gartel, A. L. & Tyner, A. L. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* **1**, 639–649 (2002).
572. Carra, S., Seguin, S. J., Lambert, H. & Landry, J. HspB8 chaperone activity toward poly(Q)-containing proteins depends on its association with Bag3, a stimulator of macroautophagy. *J. Biol. Chem.* **283**, 1437–1444 (2008).
573. Shimmyo, Y., Kihara, T., Akaike, A., Niidome, T. & Sugimoto, H. Multifunction of Myricetin on Ab: Neuroprotection Via a Conformational Change of Ab and Reduction of Ab Via the Interference of Secretases. *J. Neurosci. Res.* **86**, 368–377 (2008).
574. Westhoff, B., Chapple, J. P., Van Der Spuy, J., Höhfeld, J. & Cheetham, M. E. HsJ1 is a neuronal shuttling factor for the sorting of chaperone clients to the proteasome. *Curr. Biol.* **15**, 1058–1064 (2005).
575. La Cour, T. *et al.* Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng. Des. Sel.* **17**, 527–536 (2004).
576. Mazel, M. *et al.* Frequent expression of PD-L1 on circulating breast cancer cells. *Mol. Oncol.* 1–10 (2015). doi:10.1016/j.molonc.2015.05.009
577. Satelli, A. *et al.* Potential role of nuclear PD-L1 expression in cell-surface vimentin positive circulating tumor cells as a prognostic marker in cancer patients. *Sci. Rep.* **6**, 28910 (2016).
578. Schwarz, F. & Aebi, M. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**, 576–582 (2011).
579. Lim, S. O. *et al.* Deubiquitination and Stabilization of PD-L1 by CSN5. *Cancer Cell* **30**, 925–939 (2016).
580. Li, C. W. *et al.* Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity. *Nat. Commun.* **7**, 1–11 (2016).
581. Li, C. W. *et al.* Eradication of Triple-Negative Breast Cancer Cells by Targeting Glycosylated PD-L1. *Cancer Cell* **33**, 187–201.e10 (2018).
582. Kamei, N. *et al.* Definitive evidence that a single N-glycan among three glycans on inducible costimulator is required for proper protein trafficking and ligand binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 557–563 (2010).
583. Pelakanou, V. & Rehman, J. Quantitative Assessment of the Heterogeneity of PD-L1 Expression in Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC). *JAMA Oncol.* **2**, 46–54 (2016).
584. Junutula, J. R. *et al.* Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. *Nat. Biotechnol.* **26**, 925–932 (2008).
585. Clark, C. A. *et al.* Tumor-intrinsic PD-L1 signals regulate cell growth, pathogenesis, and autophagy in ovarian cancer and melanoma. *Cancer Res.* **76**, 6964–6974 (2016).
586. Ikebuchi, R. *et al.* Influence of PD-L1 cross-linking on cell death in PD-L1-expressing cell lines and bovine lymphocytes. *Immunology* **142**, 551–561 (2014).
587. Tamura, H. *et al.* Marrow stromal cells induce B7-H1 expression on myeloma cells,

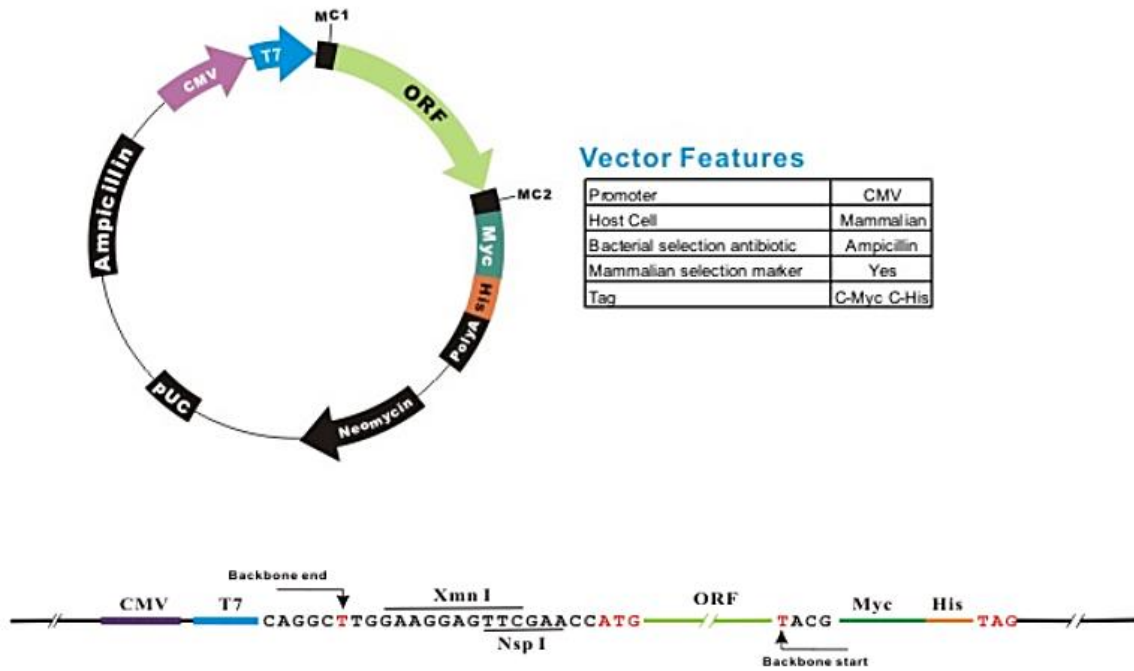
- generating aggressive characteristics in multiple myeloma. *Leukemia* **27**, 464–72 (2013).
588. Ishikawa, F. *et al.* Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor γ chainnull mice. *Blood* **106**, 1565–1573 (2005).
589. Kandoth, C. *et al.* Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* **502**, 333–339 (2013).
590. Kim, M. P., Zhang, Y. & Lozano, G. Mutant p53: Multiple Mechanisms Define Biologic Activity in Cancer. *Front. Oncol.* **5**, 1–6 (2015).
591. Walerych, D. *et al.* Proteasome machinery is instrumental in a common gain-of-function program of the p53 missense mutants in cancer. *Nat. Cell Biol.* **18**, 897–909 (2016).
592. Yue, X. *et al.* Mutant p53 in Cancer: Accumulation, Gain-of-Function, and Therapy. *J. Mol. Biol.* **429**, 1595–1606 (2017).
593. Lambert, J. M. R. *et al.* PRIMA-1 Reactivates Mutant p53 by Covalent Binding to the Core Domain. *Cancer Cell* **15**, 376–388 (2009).
594. Manstein, V. *et al.* Resistance of Cancer Cells to Targeted Therapies Through the Activation of Compensating Signaling Loops. *Curr. Signal Transduct. Ther.* **8**, 193–202 (2013).
595. Carroll, D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* **188**, 773–82 (2011).

ANNEXES

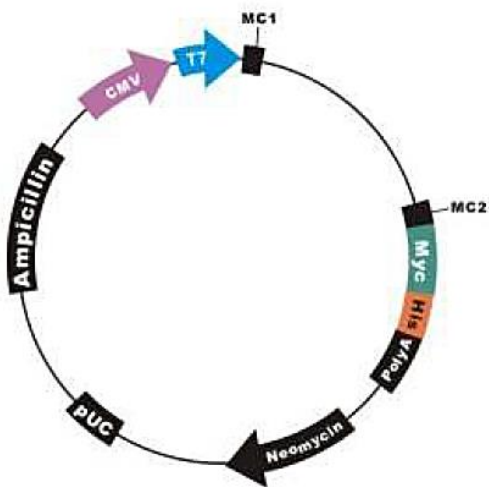
ANNEXES

1. Annexe 1 : Carte des vecteurs plasmidiques

A. Vecteur EX-U0767-M10



B. Vecteur EX-NEG-M10

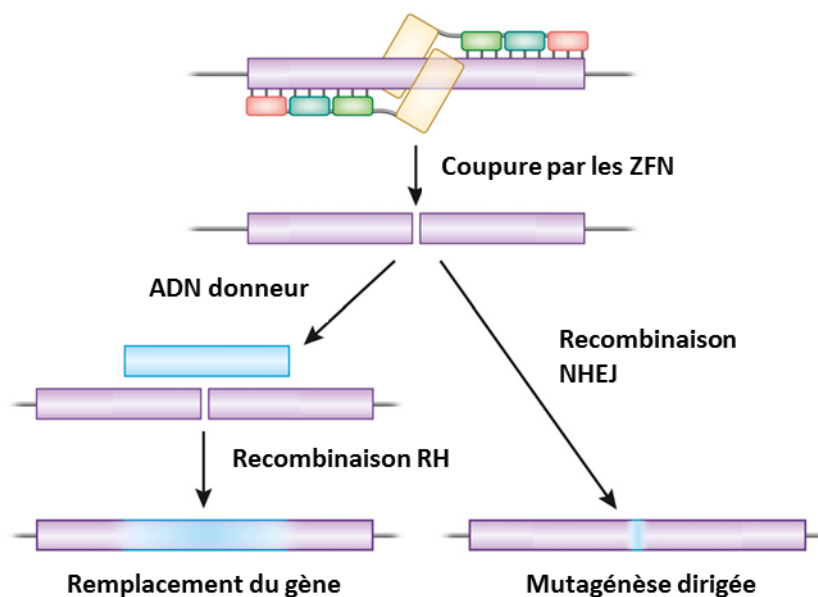


2. Annexe 2 : *CompoZR Zinc Finger Nuclease* ciblant le gène *CD274*

Principe de fonctionnement des ZFN :

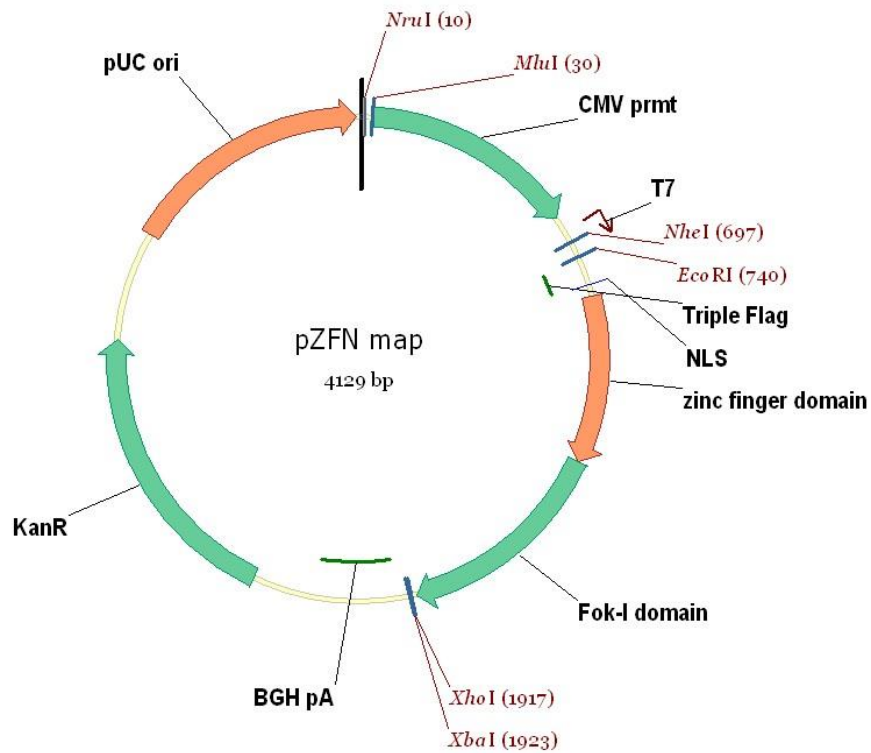
Les ZFN (Zinc Finger Nucleases), de protéines de liaison à l'ADN, facilitent l'édition du génome en se liant à un locus spécifique et en provoquant une cassure double brin (DSB, *double-strand break*). La cellule utilise ensuite des processus endogènes de réparation de l'ADN : soit une Jonction d'extrémités non homologues (NHEJ), soit une recombinaison homologue (HR) en présence d'ADN donneur. Dans notre cas, n'ayant pas d'ADN donneur, les ZFN du kit *CompoZR Zinc Finger Nuclease* que nous avons utilisé agissent selon le processus NHEJ en générant des mutations au niveau de la région ciblée du gène *CD274*.

Les ZFN possèdent deux domaines fonctionnels : *i*) un domaine de liaison à l'ADN comprenant 4 à 6 protéines à doigts de Zinc, spécifiques d'une séquence de 12 à 18 paires de bases, au niveau du gène d'intérêt ; *ii*) un domaine correspondant à la nucléase *FokI*, fonctionnant dans le cas présent en homodimère et permettant la coupure de l'ADN. Une paire de ZFN est donc nécessaire afin de se lier et cliver l'ADN génomique au niveau de la région ciblée, ce qui assure leur spécificité. Les séquences cibles des deux monomères ZFN doivent être séparées de 5 à 7 paires de bases pour que ces ZFN puissent s'homodimériser et être catalytiquement actifs. Les événements de délétion et d'insertion ensuite provoqués par le processus NHEJ et se produisant dans les cellules transfectées par les ZFN génèrent des cellules dont le gène ciblé contient une mutation bi-allélique ou mono-allélique. A partir de ce pool, il est possible d'isoler les clones cellules dont le génome a été édité.



Mode de fonctionnement des ZFN. Schéma adapté de ⁵⁹⁵.

Carte plasmidique du vecteur ZFN :



Site de liaison des ZFN au niveau du gène *CD274* :

5'-CCAGTCACCTCTGAACATGaactgaCATGTCAGGCTGAGGGCT-3'

Cette séquence correspond au brin sens de l'ADN.

Bases en majuscule : sites de liaison des ZFN.

Bases en minuscule : séquence de coupure par les nucléases.

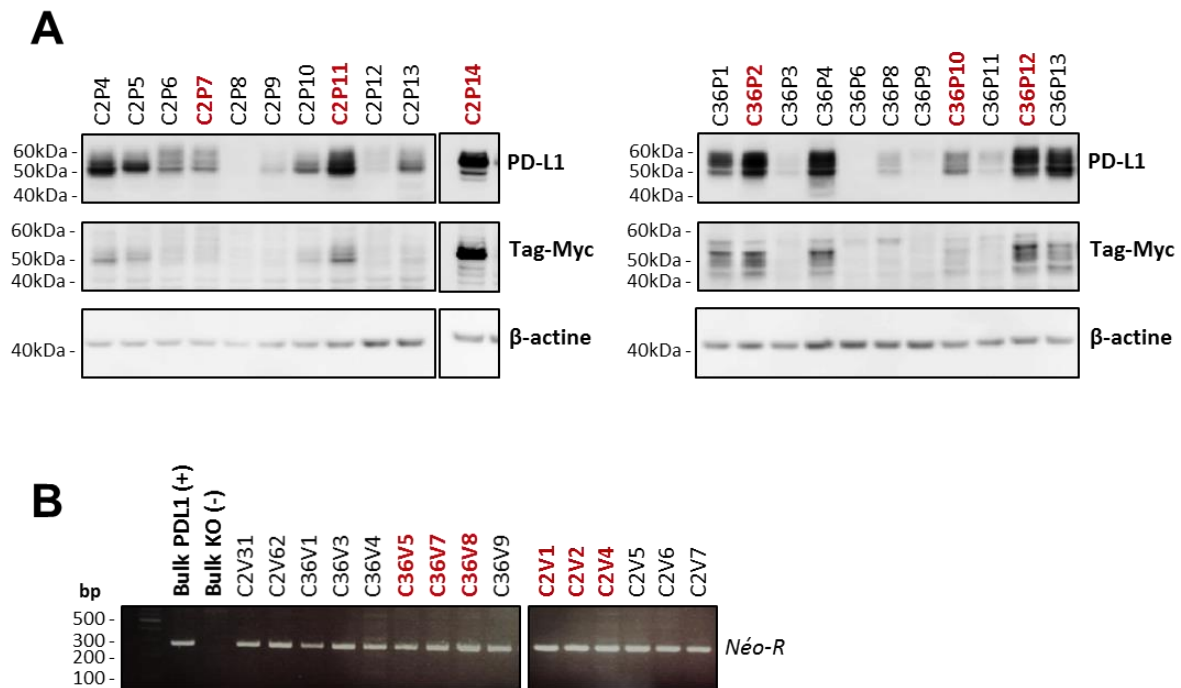
3. Annexe 3 : Validation des régions *OFF-target* potentielles des ZFN

Amorces utilisées pour les PCR et le séquençage des régions *OFF-target* des ZFN.

OFF-target	N° Chr.	Nombre de mésappariements	Amorces pour PCR (5' → 3')	Amorces pour séquençage (5' → 3')
cd274	chr9	0	F: CAGAGCTAGCAGGTGTTCCC R: TGTTGATTCTCAGTGTGCTGG	CAGAGCTAGCAGGTGTTCCC
n°1	chr7	7	F: CACTGACCCGAGACTCTGAG R: GGGTCTGAGGGTGATTG	GCAGAGTGGGACAGAAAAAC
n°2	chr3	8	F: GAAGACCCAGACCTCATTGC R: GGACAACCTCAGGACAGTGC	CTAGGCATGTGACTGGTAG
n°3	chr8	8	F: GGGTCATTATTTCAAAGTCC R: GAGTTTGTGAGGATATTAGACG	AGAGCAAAATTGGGATG
n°4	chr1	8	F: GGTCAGGCTCCATCATCTCG R: CAAGCCGTCTGAAGTCCAC	CAGGCAATATGACAGAGC
n°56	chr22	9	F: CAGATGAGGGGTTGATGGGC R: CACAATACCTCCTACCATCACCC	CAGATGAGGGGTTGATGGGC
n°7	chr3	9	F: GAGTAATGAGTAGAGGTTGAAAG R: CAGTTATACCTTGACCATC	TAGCCTAGATTGCTTTTCAG
n°8	chr16	9	F: GGTAGAGACTGAGTTTTGACG R: CACTCCTCATTCCCTTTTG	GGTAGAGACTGAGTTTTTG
n°9	chr19	9	F: GTCCTCCAGTGTGCCTCTC R: CGAGGGGGTTATACATACAAAG	GAGCCTTGTTCACTGGTTC
n°10	chr19	9	F: GTATAATGGGTAGAGGCTGG R: GGCTTTTCAGTCACTTCTCAC	CCTACATTGTCATGATTGG
n°11	chr17	9	F: GCTGTCCGTCTCACTCTAGC R: AATCCTTGGCCCCATACCAC	AGCTTGGGAGGCTAAGGAAG
n°12	chr17	9	F: GGCTCTGTCTGCTGTCTTAC R: GGACTGTTGTGAGGATTAATG	ATTTGAGGAGGGAGCAG
n°13	chr20	9	F: CCCTGGAAGTGAACCTCAAG R: CTCCTGACTTCAAATGATCC	TAATCCCAGCACTCTAGG
n°14	chr18	9	F: CTTCTTTAGCCTGACCTTGG R: CTCCTTAGTCCCCAGTAGC	AATTAGCCAGGCATGGTGT
n°15	chr14	9	F: GCATCTACTCCGCTTCTGG R: GCTTGTGTTCTGTGAGGTGTG	AAATCACATGGCCAGAGC
n°16	chr1	9	F: GGACGACCCCTTGAGCACAG R: CCTGGAAGCTCTGAATGTGAAC	GGACGACCCCTTGAGCACAG
n°17	chr1	9	F: CCAATCTTCTTTCAAACAGCAC R: GATACAGCCTTCAGAAAACAGC	CAAGTGTTTTCCAAGTCAC
n°18	chr4	9	F: CACCTCAGCCTCCTAAACTAC R: GTTCTTTTCGCTCTTGTTC	CACCTCAGCCTCCTAAACTAC
n°19	chr4	9	F: CAGCCACCTTTTTCTATC R: CCTTCTGGAGCACTTATTTG	TATACTCTTCAGGCAAGAG
n°20	chr6	9	F: GCTGAGGGAAAACAATGAAC R: CTGATGGAACGCCTAGAGAG	GGGATTCAAGCGTTTCATG
n°21	chr9	9	F: CAGGTGTATGTATTGGAGCC R: GAAGTTAAAAGGGAAGAGAGC	GTGGACATCCAGTCAACTC
n°22	chr21	9	F: GTTTCTGTGGACTGCGGAC R: GCTGGCTTCTCTCATGAC	ATGAACACCAGTTACACAG

4. Annexe 4 : Sélection des clones cellulaires MDA-MB-231 ± PD-L1

La validation des clones cellulaires exprimant la protéine PD-L1 de façon stable a été effectuée par Western-blot (en **A**). Le bulk MDA-MB-231 « PD-L1 » a été réalisé à partir de 3 clones transfectés de manière stable et issus du clone *CD274-KO* 2 ainsi que du clone *CD274-KO* 36. De même, les clones cellulaires transfectés de manière stable avec le plasmide contrôle ont été validés par une PCR l'amplifiant le gène de résistance à la néomycine, cassette de résistance à l'antibiotique présente dans le plasmide pReceiver-M10. Parmi les différents clones cellulaires issus des clones *CD274-KO* 2 et 36 validés (en **B**), 3 de chaque ont été sélectionnés pour la génération du bulk de cellules « VIDE ». Les clones sélectionnés sont indiqués en rouge.



A) Expression de la protéine PD-L1 analysée par Western-blot pour les 11 clones transfectés de façon stable issus du clone 2 *CD274-KO* (panel de gauche) et du clone 36 *CD274-KO* (panel de droite). Le vecteur possédant un tag-Myc, un anticorps ciblant celui-ci a également été testé. Les clones ayant servi pour la génération du bulk MDA-MB-231 « PD-L1 » sont indiqués en gras et en rouge. La β-actine est utilisée comme témoin de charge. **B)** PCR amplifiant le gène de résistance à la néomycine, réalisée à partir de l'ADNg de 15 clones transfectés de façon stable avec le vecteur contrôle pReceiver-M10 et déposées sur gel d'agarose 2%. Le « bulk PD-L1 » est le contrôle positif, contrairement au « bulk KO » qui est notre témoin négatif. Les clones utilisés pour la génération du bulk MDA-MB-231 « VIDE » sont indiqués en gras et en rouge.

5. Annexe 5 : Liste des gènes différemment exprimés entre les lignées MDA-MB-231 « VIDE » et « PD-L1 »

La liste complète des gènes dérégulés et dont le ratio d'expression entre les deux lignées est supérieur ou égal à $|1,8|$. Certains gènes présentent plusieurs valeurs car plusieurs sondes ont été utilisées pour mesurer leur expression. Le tableau de gauche correspond aux gènes réprimés par l'expression de PD-L1, alors que celui de droite présente les gènes induits par cette protéine.

Gènes réprimés par PD-L1			Gènes induits par PD-L1		
Sonde utilisée	Gène	FC ([PDL1] vs [VIDE])	Sonde utilisée	Gène	FC ([PDL1] vs [VIDE])
A_23_P94800	S100A4	-5,7893753	A_23_P106389	SEMA7A	1,8136169
A_23_P86100	KLHDC9	-5,7864923	A_33_P3401267	FEZ2	1,8222075
A_32_P196263	ADAMTS9	-4,989802	A_21_P0000491	SNAR-G1	1,8251333
A_33_P3220698	EPS8L1	-4,339021	A_32_P163247	CD8A	1,8267528
A_23_P207507	ABCC3	-4,2642045	A_23_P429449	NKD1	1,83042
A_33_P3415395	SPTLC3	-3,715522	A_23_P93269	ZNF165	1,8310221
A_24_P237270	ADORA2A	-3,6756291	A_21_P0011843	PGM5	1,8329209
A_33_P3359900	EMB	-3,6571224	A_23_P426663	MITF	1,8355697
A_23_P360754	ADAMTS4	-3,4728212	A_23_P142389	LSR	1,8381122
A_33_P3408918	SAA2	-3,269883	A_23_P415611	SLC9B1	1,8396062
A_24_P684186	EMB	-3,2320235	A_33_P3318796	FSTL3	1,847576
A_24_P234415	STAC	-3,229416	A_23_P120103	KCNS3	1,8632123
A_24_P335092	SAA1	-3,2267718	A_33_P3418541	ACTG2	1,8812293
A_33_P3326777	CAGE1	-3,1166797	A_23_P3379	RASGRF1	1,8881096
A_33_P3405213	PECAM1	-3,1141553	A_23_P432598	CHMP4C	1,8953077
A_33_P3275846	CACNA1A	-2,8910103	A_23_P146551	MOB3B	1,9004575
A_24_P286114	SLC1A3	-2,8133683	A_23_P13822	STYK1	1,9170059
A_23_P77993	C1QL1	-2,714578	A_23_P28466	DAW1	1,9178567
A_33_P3367692	CFH	-2,5738778	A_23_P34382	CLCA3P	1,9187686
A_23_P72737	IFITM1	-2,5211673	A_23_P143143	ID2	1,9328297
A_23_P69497	CLEC3B	-2,5038705	A_23_P204630	NTN4	1,9339455
A_23_P252471	PECAM1	-2,4796915	A_24_P923251	TGM2	1,9433454
A_33_P3290343	CYP1B1	-2,4710217	A_23_P316612	GLIS1	1,9708577
A_23_P78108	ALDOC	-2,4635592	A_23_P122924	INHBA	1,9911768
A_23_P103756	OVGP1	-2,34171	A_23_P162579	HSPB8	1,9928858
A_33_P3243439	GPR162	-2,2988958	A_32_P209094	FGGY	2,0085106
A_23_P103256	CFHR3	-2,2650847	A_33_P3423270	TMEM40	2,0158358
A_23_P1962	RARRES3	-2,260474	A_23_P91697	LARGE	2,042016
A_23_P168771	CCDC146	-2,2564795	A_33_P3389827	PROM2	2,049304
A_33_P3290729	POU3F2	-2,2349205	A_32_P225659	UTS2B	2,0520773
A_23_P114740	CFH	-2,2289364	A_24_P32085	MOB3B	2,0671737
A_24_P105933	VIPR1	-2,220099	A_23_P48740	DIO2	2,0720065
A_24_P416997	APOL3	-2,1994188	A_23_P11685	PLA2G4A	2,0760372

A_23_P70318	ENPP4	-2,1957102	A_32_P69368	ID2	2,0899901
A_24_P408047	PLEKHA4	-2,1920514	A_33_P3391418	TMEM40	2,1088538
A_33_P3394972	OSBPL5	-2,1913462	A_23_P2814	SMAD9	2,116513
A_24_P203000	IL2RB	-2,1803443	A_24_P254949	PGM5	2,1425254
A_33_P3355014	TMEM229B	-2,1720452	A_23_P129458	SDR42E1	2,166384
A_33_P3297020	PSORS1C3	-2,1672766	A_32_P43717	FAM189A2	2,1787603
A_23_P140725	IFT140	-2,109348	A_23_P123393	KCNQ3	2,1827972
A_23_P379034	BAIAP2L2	-2,0616577	A_23_P111311	AKAP12	2,18818
A_23_P71530	TNFRSF11B	-2,036565	A_32_P219660	SPANXA1	2,1890574
A_33_P3446495	FRMD4B	-2,0333478	A_23_P152305	CDH11	2,199556
A_23_P208866	GMFG	-1,9918557	A_21_P0013470	FAM66D	2,2105186
A_23_P107744	S1PR5	-1,9858528	A_33_P3316273	CCL3	2,2427602
A_23_P57658	HRASLS	-1,9836065	A_33_P3269636	SBSN	2,2532735
A_23_P396858	FZD8	-1,9697193	A_23_P42784	STK31	2,2708952
A_23_P416395	STC2	-1,9292779	A_32_P152437	AKAP12	2,2902505
A_23_P24234	OPN4	-1,9159614	A_33_P3380944	GPR116	2,2908852
A_23_P74391	OPN3	-1,9132892	A_33_P3246985	PDE4DIP	2,3159733
A_33_P3352019	SCARA3	-1,9128237	A_24_P226755	TOX	2,348682
A_23_P78608	DENND1C	-1,8945419	A_32_P34138	FAM25A	2,4126377
A_23_P416894	GSAP	-1,8853322	A_33_P3219651	BMPER	2,4188328
A_23_P78742	FLT3LG	-1,8721699	A_23_P259071	AREG	2,4796834
A_23_P316472	DNHD1	-1,8608476	A_33_P3242543	MAOA	2,4806051
A_23_P129903	TRIM16L	-1,8541121	A_23_P144827	FBXL7	2,5079134
A_23_P44569	ABCC2	-1,8460032	A_23_P214897	AKAP12	2,5397003
A_33_P3318288	CFH	-1,8398719	A_33_P3233608	SPANXC	2,6052961
A_23_P74290	GBP5	-1,8368254	A_24_P305784	SPANXB1	2,616437
A_33_P3284453	SOGA3	-1,8354435	A_23_P26854	ARHGAP44	2,6593235
A_33_P3382303	FMNL1	-1,8208392	A_33_P3246885	DMKN	2,705988
A_23_P42306	HLA-DMA	-1,8080606	A_33_P3220837	MAFB	2,7156053
A_24_P252364	NRCAM	-1,8058586	A_33_P3375790	RFPL4AL1	2,7204134
			A_23_P141802	SERPINB7	2,7353997
			A_33_P3358183	PTGFR	2,7533333
			A_23_P253692	GPR64	2,7940047
			A_33_P3421913	CADM1	2,8432958
			A_23_P74088	MMP23B	2,8645673
			A_33_P3286953	ADAMTS6	2,98839
			A_23_P38959	VAV1	3,1396995
			A_23_P331748	CD33	3,1423924
			A_33_P3376551	PTGFR	3,1935098
			A_33_P3366127	RFPL4AL1	3,2250957
			A_33_P3363420	FRMD3	3,561223
			A_23_P167599	FAM134B	3,6096022
			A_33_P3363425	FRMD3	3,6342459
			A_24_P263653	DOCK2	3,7361193
			A_23_P34031	XAGE2	3,961254
			A_24_P395814	CGB	4,3936076
			A_23_P113553	MAGEA11	4,446805
			A_24_P810290	PPAPDC1A	4,4500732
			A_33_P3639068	GFRA1	4,912235

A_33_P3246883	DMKN	5,2721686
A_33_P3290780	IL24	5,3059826
A_23_P169017	DEFB103B	5,3679023
A_33_P3232692	IL24	5,7704043
A_23_P320261	DMKN	6,9624133
A_32_P231568	RASEF	10,987936
A_33_P3381513	CD274	534,4837

6. Annexe 6 : Résultats de l'analyse *in silico* des membres B7

Analyse *in silico* des corrélations entre l'expression des gènes des protéines B7 et des gènes de la glycolyse ou de réponse au stress oxydatif. Les coefficients de corrélation de Pearson (r^2) et les valeurs de la p-value (p) sont indiqués pour chaque paire de gènes. Réalisée à partir de 3 bases de données d'échantillons de patients atteints d'un cancer du sein (GSE20685, GSE21653 et GSE65216).

	GSE		LDHA	PDHK1	SLC2A1 (GLUT1)	SLC2A3 (GLUT3)	SOD2	HMOX1	GSTM3	NQO2
CD274	20685	r^2	0.18	0.44	0.22	0.36	0.63	0.33	-0.31	-0.009
		p	0.001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
	21653	r^2	0.18	0.31	0.27	0.35	0.57	0.32	-0.25	0.01
		p	0.005	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
	65216	r^2	0.07	0.29	0.14	0.35	0.68	0.36	-0.24	0.02
		p	ns	0.0003	ns	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.002	ns
CD80	20685	r^2	0.28	0.33	0.14	0.37	0.52	0.41	-0.42	0.02
		p	< 0.0001	< 0.0001	0.012	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	ns
	21653	r^2	0.24	0.28	0.15	0.30	0.45	0.25	-0.34	-0.05
		p	0.0002	< 0.0001	0.018	< 0.0001	< 0.0001	0.0001	< 0.0001	ns
	65216	r^2	0.07	0.23	0.09	0.30	0.56	0.35	-0.17	-0.04
		p	ns	0.004	ns	0.0002	< 0.0001	< 0.0001	0.033	ns
CD86	20685	r^2	0.21	0.41	0.04	0.53	0.63	0.62	-0.38	0.13
		p	0.0002	< 0.0001	ns	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.022
	21653	r^2	0.38	0.39	0.13	0.39	0.62	0.57	-0.27	0.23
		p	< 0.0001	< 0.0001	0.0479	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.0004
	65216	r^2	0.13	0.21	0.09	0.38	0.62	0.56	-0.27	0.02
		p	ns	0.009	ns	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.0008	ns
PD-L2	20685	r^2	0.09	0.30	0.03	0.38	0.45	0.28	-0.28	0.07
		p	ns	< 0.0001	ns	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	ns
	21653	r^2	0.28	0.41	0.11	0.35	0.44	0.30	-0.27	0.02
		p	< 0.0001	< 0.0001	ns	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	ns
	65216	r^2	0.12	0.10	0.006	0.23	0.25	0.17	-0.07	0.02
		p	ns	ns	ns	0.0048	0.002	0.039	ns	ns
CD276	20685	r^2	0.11	0.04	0.11	0.25	-0.03	0.11	-0.12	0.05
		p	0.046	ns	0.051	< 0.0001	ns	0.036	0.034	ns
	21653	r^2	0.21	-0.06	0.14	0.03	0.08	0.32	0.04	0.30
		p	0.001	ns	0.024	ns	ns	< 0.0001	ns	< 0.0001
	65216	r^2	0.08	-0.16	0.09	0.04	-0.15	0.15	0.05	0.22
		p	ns	0.042	ns	ns	ns	0.059	ns	0.007
B7-H4	20685	r^2	0.019	-0.12	-0.13	-0.05	0.03	-0.09	0.08	-0.04
		p	ns	0.026	0.017	ns	ns	ns	ns	ns
	21653	r^2	0.16	-0.02	0.16	0.11	0.26	-0.11	0.02	-0.11
		p	0.01	ns	0.013	ns	< 0.0001	ns	ns	ns
	65216	r^2	0.06	0.01	-0.02	0.07	0.08	-0.16	0.06	-0.11
		p	ns	ns	ns	ns	ns	0.043	ns	ns

	GSE		ABCC2	CYBB	NOX4	GPX1	GPX2	GPX4	ATOX1	GSTP1
CD274	20685	r ²	0.15	0.68	-0.08	0.23	-0.09	-0.27	0.21	0.16
		p	0.008	< 0.0001	ns	< 0.0001	ns	< 0.0001	0.0001	0.004
	21653	r ²	0.16	0.73	-0.009	0.23	-0.13	-0.11	0.13	0.23
		p	0.011	< 0.0001	ns	0.0002	0.036	ns	0.044	0.0003
	65216	r ²	0.08	0.81	-0.20	0.14	-0.21	-0.32	0.21	0.26
		p	ns	< 0.0001	0.014	ns	0.008	< 0.0001	0.008	0.001
CD80	20685	r ²	0.07	0.63	0.11	0.33	-0.08	-0.15	0.24	0.11
		p	ns	< 0.0001	0.055	< 0.0001	ns	0.006	< 0.0001	0.042
	21653	r ²	0.16	0.58	0.06	0.13	-0.24	-0.16	0.06	0.14
		p	0.013	< 0.0001	ns	0.045	0.0001	0.012	ns	0.028
	65216	r ²	0.06	0.75	-0.12	0.20	-0.14	-0.24	0.20	0.12
		p	ns	< 0.0001	0.131	0.011	ns	0.002	0.013	0.143
CD86	20685	r ²	0.14	0.85	0.11	0.49	-0.13	-0.15	0.21	0.25
		p	0.012	< 0.0001	0.048	< 0.0001	0.016	0.006	0.0002	< 0.0001
	21653	r ²	0.17	0.83	0.17	0.51	-0.14	0.08	0.27	0.30
		p	0.0061	< 0.0001	0.0069	< 0.0001	0.034	ns	< 0.0001	< 0.0001
	65216	r ²	-0.02	0.86	-0.04	0.46	-0.17	-0.28	0.31	0.23
		p	ns	< 0.0001	ns	< 0.0001	0.029	0.0005	< 0.0001	0.004
PD-L2	20685	r ²	0.15	0.51	0.03	0.18	-0.17	-0.17	0.02	0.18
		p	0.005	< 0.0001	ns	0.001	0.002	0.001	ns	0.0003
	21653	r ²	0.20	0.66	0.07	0.28	-0.21	0.02	0.11	0.18
		p	0.001	< 0.0001	ns	< 0.0001	0.0009	ns	ns	0.006
	65216	r ²	0.02	0.44	-0.002	0.25	-0.04	0.02	0.20	0.02
		p	ns	< 0.0001	ns	0.002	ns	ns	0.013	0.770
CD276	20685	r ²	0.07	-0.02	0.38	0.17	-0.02	-0.004	0.14	0.005
		p	ns	ns	< 0.0001	0.002	ns	ns	0.01	0.928
	21653	r ²	0.03	0.008	0.32	0.34	0.15	0.26	0.07	0.03
		p	ns	ns	< 0.0001	< 0.0001	0.015	< 0.0001	ns	0.646
	65216	r ²	-0.08	-0.15	0.29	0.20	0.07	0.09	0.15	-0.09
		p	ns	0.056	0.0002	0.010	ns	ns	0.059	0.232
B7-H4	20685	r ²	-0.05	-0.14	0.07	-0.07	-0.11	0.003	-0.21	0.10
		p	ns	0.009	ns	ns	0.044	ns	0.0001	0.07
	21653	r ²	-0.14	-0.05	0.12	-0.01	-0.17	-0.27	-0.12	0.32
		p	0.023	ns	0.0589	ns	0.008	< 0.0001	0.056	< 0.0001
	65216	r ²	-0.07	-0.13	0.08	-0.11	-0.13	-0.24	-0.48	0.19
		p	ns	ns	ns	ns	ns	0.003	< 0.0001	0.02