

UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES FONDAMENTALES SANTÉ (SFS)

THÈSE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Présentée et soutenue publiquement par

Déborah NEYRINCK-LEGLANTIER

Le 10 décembre 2018

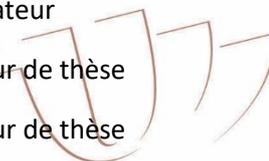
IMPLICATION DE *ZONULA OCCLUDENS-1* DANS LES PROCESSUS PRO-INFLAMMATOIRES ASSOCIÉS À LA PROGRESSION MÉTASTATIQUE DES CANCERS BRONCHO-PULMONAIRES

Thèse dirigée par le **Professeur Myriam POLETTE**, Université de Reims Champagne-Ardenne

Et par le **Docteur Christine GILLES**, Université de Liège

JURY

Mme	le Professeur Michèle BEAU-FALLER (Université de Strasbourg, France)	Présidente du jury
M.	le Professeur Charles PILETTE (Université de Louvain, Belgique)	Rapporteur
M.	le Docteur Daniel POULIQUEN (Université de Nantes, France)	Rapporteur
M.	le Professeur Stéphane DEDIEU (Université de Reims, France)	Examineur
Mme	le Docteur Christine GILLES (Université de Liège, Belgique)	Directeur de thèse
Mme	le Professeur Myriam POLETTE (Université de Reims, France)	Directeur de thèse



A mes parents,
Nicole & Bruno

Remerciements

Je remercie le **Professeur Myriam Polette**, directeur de l'unité Inserm UMR-S 1250, de m'avoir permis de m'épanouir sur ce projet de recherche en m'accueillant au sein de son laboratoire durant ces années de thèse.

Je remercie le **Professeur Charles Pilette** et le **Docteur Daniel Pouliquen** d'avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteurs, ainsi que les **Professeurs Michèle Beau-Faller et Stéphane Dedieu** en qualité d'examineurs et jurés de mon comité de suivi thèse. Je vous remercie pour l'intérêt et le suivi que vous portez à mon travail de thèse.

Je remercie à nouveau le **Professeur Myriam Polette**, cette fois-ci en qualité de directrice de thèse. Myriam, je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée, du début jusqu'à la fin. Merci pour ton écoute, ta compréhension et tes conseils précieux. Ton énergie et ta passion pour la recherche, associées à ta source de connaissances ont été un modèle à mes yeux et un réel moteur à l'aboutissement de ce travail. Merci pour toute l'aide que tu m'as apportée, autant scientifique qu'humaine.

Tout ce travail n'aurait pas été rendu possible sans l'aide précieuse de ma seconde directrice de thèse, le **Docteur Christine Gilles**. Je te remercie infiniment pour le temps que tu m'as accordé au cours de mes nombreux aller-retours en Belgique. Merci de m'avoir intégrée au sein de la « team EMT », avec ton enthousiasme et ta joie de vivre. Tu m'as également laissé admirative de ta capacité à encadrer un nombre incalculable de doctorants, avec une rigueur scientifique et des échanges souvent teintés d'humour. Mon vocabulaire belge s'est vu grandement enrichi à tes côtés !

Myriam, Christine, je tiens à vous remercier ensemble pour votre présence dans les moments difficiles et vos conseils avisés. Merci de m'avoir tant appris au travers de votre confiance et merci de vos grandes qualités humaines et scientifiques ! Votre humour est une arme indispensable pour garder la bonne humeur du « moineau crevé ». Merci.

Mes remerciements vont également au **Professeur Philippe Birembaut** pour sa gentillesse, sa disponibilité et son expertise d'anatomopathologiste dans la spécificité et le scoring des immunomarquages.

Merci également au **Docteur Béatrice Nawrocki-Raby** pour son implication et son aide précieuse tout au long de ce travail. Béatrice, merci de ta disponibilité, de tes conseils et de encouragements lors de la relecture du manuscrit.

J'adresse également des remerciements particuliers aux **Docteurs Arnaud Bonnomet et Silvia Blacher** pour leur contribution en analyse d'image et leur développement de macros. Arnaud, merci pour ta participation dans les nombreuses acquisitions d'images et pour tes nombreux coups de mains informatiques. J'en profite également pour te remercier de ton encadrement au cours de mon stage de master recherche. Silvia, merci pour les journées passées ensemble à analyser et quantifier un nombre incommensurable d'images. Merci pour

ta patience et ta pédagogie. Dans le même registre, je tiens à remercier les **Docteurs Antoine Jonquet, Jérôme Cutrona et Christine Terry**n pour leurs conseils et dépannages informatiques.

Je remercie également l'ensemble des **membres de l'unité Inserm UMR-S 1250** avec qui j'ai partagé le quotidien durant ma thèse.

Merci aux **Docteurs Jean-Marie Tournier, Christelle Coraux, Céline Charlier et Valérian Dormoy** pour tous leurs conseils. Un grand merci à **Eymeric Lagonotte, Adeline Germain et Nathalie Lalun** pour leur aide technique précieuse, surtout en cette fin de rédaction. Merci à **Claire Kileztky** pour ses conseils, son aide et sa disponibilité. Merci à **Olivier Bernardini et Alexandre Abreder** pour vos coups de mains, vos encouragements et votre présence. Un grand merci enfin à **Annie Chavériat** pour sa disponibilité, sa bonne humeur et son aide logistique dans les multiples ordres de mission effectués et autres méandres administratifs.

Je tiens à remercier le **Docteur Julien Lesage**, mon collègue de bureau pendant ma première année de doctorat et un ami durant les autres. Merci de tes nombreux conseils, tes aides précieuses, tes remarques avisées, tes encouragements et ton soutien. Je te souhaite de nombreuses réussites à commencer par ta première expérience aux Etats-Unis. J'en profite pour adresser mes remerciements aux **Docteurs Amina Jouda, Anaïs Navarre-Bas, Céline Mourareau** et, à l'as de l'informatique **Philippe Noël**, qui m'ont précédé, pour leur accueil lors de mon arrivée en thèse et leur joie de vivre.

J'adresse également mes remerciements aux **Docteurs Emilie Luzcka et Julie Routhier** pour leur gentillesse, leur aide et leur patience à toute épreuve. Merci aux futurs docteurs **Jordan da Silva, Elodie Serbiné, Randa Belgacemi** pour leur bonne humeur, leur soutien et leur collaboration. Je vous souhaite sincèrement tous mes vœux de réussite pour vos dernières années de thèse à venir. Julie & Jordan, un merci particulier à mes acolytes du bureau voisin pour toutes nos discussions de débats scientifiques et de soutien moral mutuel. J'ai également une pensée pour mes collègues de bureau transitoire, toutes très agréables et gentilles, à commencer par **Ioana Ciupea, Margot Vieubled et Anaëlle Muggeo**.

Enfin, j'associe à ces remerciements les **membres du laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement (LBTD)** de l'Université de Liège.

Je remercie d'abord sa directrice, le **Professeur Agnès Noël**, d'avoir rendu ce projet possible en m'accueillant dans son laboratoire dans le cadre de notre collaboration avec le Docteur Christine Gilles.

Mes remerciements s'adressent également à **Erika Konradowski, Emilie Feyereisen, Isabelle Dasoul, Nathalie Lefin, Céline Vanwingue, Nathacha Rocks et Catherine Gérard** pour leur précieuse contribution technique et leur attention. Erika, un grand merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et ton aide précieuse au cours des expérimentations animales. Emilie et Isabelle, merci pour votre écoute, vos conseils, votre disponibilité, et vos nombreux coups de main techniques. Nathalie, merci pour la génération des plasmides. Céline, Natacha et Catherine, merci pour votre aide précieuse qui a contribué à une meilleure sérénité lors des expérimentations au FACS. Merci encore pour toute l'aide que vous m'avez apportée.

Je tiens également à remercier mes compatriotes belges pour leur accueil chaleureux, leur grain de folie et leurs nombreux services au cours de chacune de mes venues à Liège. Plus

*particulièrement, merci aux **Docteurs Maïté Fransolet et Maureen Van De Velde** pour leur aide et leur invitation à de nombreuses reprises. Merci à **Marie-Emilie Francart et Justine Lambert**, futures docteurs dans quelques mois mais également aux jeunes doctorants **Aline Vanwynsberghe et Anthony Genna** pour tous ces moments belges passés ensemble. Je vous souhaite sincèrement beaucoup de réussite pour votre avenir.*

*Pour finir, je ne peux que remercier mes proches sans qui rien n'aurait été possible. Merci à **mes parents, mes grands-parents, cousins et amis** de votre confiance et soutien quotidien. Merci de ne jamais avoir cessé de croire en moi. Papa, maman, merci d'avoir grandement participé au financement de mes études, merci de m'avoir soutenue à chaque instant et merci de votre amour. Je vous suis très reconnaissante de ma qualité de vie et espère vous rendre fiers. J'ai également une grande pensée pour mon grand-père Bernard, parti fier des études de ses petits-enfants. J'aurais aimé partager ce moment avec toi. Enfin, merci à celui qui partage maintenant ma vie. Merci pour ta présence à chaque instant, tes encouragements continuels, ta compréhension et ton aide démesurée avec une infinie gentillesse. Merci du fond du cœur à vous tous.*

Résumé

Zonula occludens 1 (ZO-1) est une protéine sous-membranaire des jonctions serrées impliquée dans l'organisation structurale des cellules épithéliales. Au cours de la progression tumorale, associée au processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), les composants des jonctions intercellulaires sont réorganisés. Notamment, lors de la TEM, la protéine ZO-1 est délocalisée de la membrane vers le cytoplasme et/ou le noyau où elle adopte alors un rôle pro-invasif. Nous avons d'ailleurs montré que ZO-1 cyto-nucléaire régule l'expression de la chimiokine IL-8 dans les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBNPC). Nous nous sommes donc intéressés à l'influence de ZO-1 cyto-nucléaire sur le recrutement des cellules inflammatoires dans les CBNPC. *In vitro*, le niveau d'expression de ZO-1 module le recrutement de la lignée monocyttaire THP-1. Par différentes techniques *in vivo*, nous avons montré que la surexpression de ZO-1 cyto-nucléaire favorise le recrutement de cellules inflammatoires et immunitaires à des temps précoce et tardif de la réponse immunitaire. En parallèle, la caractérisation de l'infiltrat inflammatoire en fonction de la localisation nucléaire de ZO-1 chez les patients atteints de CBNPC a mis en évidence une corrélation entre l'expression cyto-nucléaire de ZO-1 et la présence de lymphocytes T cytotoxiques CD8+ au sein du microenvironnement tumoral.

Ainsi, notre étude révèle un nouveau rôle de la protéine structurale ZO-1. En effet, ZO-1 cyto-nucléaire, associé au processus de TEM, est impliqué dans la mise en place et le développement d'un microenvironnement pro-inflammatoire et/ou pro-immunitaire permissif pour la progression tumorale des CBNPC.

Mots-clés : Cancer broncho-pulmonaire (CBP), *Zonula occludens* (ZO)-1, Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), Microenvironnement tumoral, Cellules inflammatoires

Abstract

Zonula occludens 1 (ZO-1) is a sub-membrane protein of tight junctions involved in the structural organization of epithelial cells. During tumor progression, associated with the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process, intercellular junction components are reorganized. In particular, during EMT, ZO-1 protein is delocalized from the membrane to the cytoplasm and/or the nucleus where it then displays pro-invasive properties. We have shown that ZO-1 cyto-nuclear regulates the expression of chemokine IL-8 in non-small cell lung cancer (NSCLC). We are therefore interested in the influence of cyto-nuclear ZO-1 on the recruitment of inflammatory cells in NSCLC. *In vitro*, the level of expression of ZO-1 modulates the recruitment of the monocyte-like cell line THP-1. By different *in vivo* techniques, we have shown that overexpression of cyto-nuclear ZO-1 promotes the recruitment of inflammatory and immune cells at early and late times of the immune response. In parallel, the characterization of the inflammatory infiltrate as a function of the nuclear localization of ZO-1 in patients with NSCLC revealed a correlation between the cyto-nuclear expression of ZO-1 and the presence of cytotoxic T lymphocytes CD8⁺ within the tumor microenvironment.

Thus, our study reveals a new role of structural protein ZO-1. Indeed, ZO-1 cyto-nuclear, associated with the EMT process, is involved in the establishment and development of a pro-inflammatory and/or pro-immune microenvironment permissive for tumor progression of NSCLC.

Keywords: Lung cancer, *Zonula occludens* (ZO)-1, Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), Tumor microenvironment, Inflammatory cells

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	6
Abstract	7
Table des matières	8
Communications scientifiques.....	12
Abréviations.....	14
Liste des figures	20
Liste des tableaux.....	22
INTRODUCTION.....	23
I. Cancer du poumon	25
1. Anatomie, histologie et fonctions physiologiques du poumon	25
1.1. Anatomie et histologie broncho-pulmonaire	25
1.2. Physiologie broncho-pulmonaire	27
2. Épidémiologie et étiologie des cancers pulmonaires.....	28
2.1. Incidence et mortalité	28
2.1.1. Dans le monde.....	28
2.1.2. En France	28
2.2. Facteurs de risques externes et internes	31
2.2.1. Tabagisme, Drogue et Alcool.....	31
2.2.2. Expositions professionnelles et environnementales.....	33
2.2.3. Prédispositions génétiques	33
3. Classification histopathologique des cancers pulmonaires	36
3.1. Carcinomes à petites cellules (CBPC)	37
3.2. Carcinomes non à petites cellules (CBNPC).....	37
3.2.1. Carcinomes épidermoïdes (CE)	38
3.2.2. Adénocarcinomes (ADC).....	38
3.2.3. Carcinomes à grandes cellules	39
3.3. Classification TNM	39
4. Stratégies thérapeutiques et traitements.....	43
4.1. Thérapies conventionnelles	43
4.2. Thérapies ciblées et biomarqueurs pronostics	44
4.3. Immunothérapies	47
4.4. Thérapies adaptées selon le type histologique	48
II. Progression tumorale et la TEM	51
1. Progression tumorale	51
1.1. Généralités sur la tumorigenèse	51
1.2. Étapes de la progression tumorale.....	52
1.2.1. Processus de transformation cellulaire	52
1.2.2. Tumorigenèse : notion de carcinome <i>in situ</i>	53
1.2.3. Invasion tumorale et métastases	55

2.	Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)	57
2.1.	Différents types de TEM	57
2.2.	Acteurs de la TEM.....	59
2.1.1.	Les jonctions intercellulaires	61
2.1.2.	Le cytosquelette	66
2.1.3.	La matrice extracellulaire (MEC)	67
2.1.4.	Les régulateurs de la TEM	68
3.	La TEM dans la progression tumorale	70
III.	Les protéines zonula occludens (ZO)	74
1.	Structure des <i>zonula occludens</i>	74
1.1.	Famille des protéines MAGUK.....	74
1.2.	Membres de la famille des ZO	75
1.2.1.	<i>Zonula occludens 1 (ZO-1)</i>	75
1.2.2.	<i>Zonula occludens 2 (ZO-2)</i>	76
1.2.3.	<i>Zonula occludens 3 (ZO-3)</i>	76
2.	Fonctions des <i>zonula occludens</i>	78
2.1.	Rôle canonique des <i>zonula occludens</i>	78
2.2.	Rôle non-canonique des <i>zonula occludens</i>	79
3.	Les ZO dans la progression tumorale.....	81
IV.	Inflammation et immunité tumorale.....	85
1.	Immunité tumorale	85
1.1.	Immunité innée	86
1.1.1.	Réponse immunitaire naturelle.....	86
1.1.2.	Cellules de l'immunité innée	86
1.2.	Immunité acquise	90
1.2.1.	Réponse immunitaire spécifique.....	91
1.2.2.	Cellules de l'immunité acquise.....	91
2.	Échappement tumoral.....	94
2.1.	Microenvironnement immunitaire pro-tumoral	94
2.2.	Recrutement des cellules immunosuppressives	97
2.2.1.	Cellules T régulatrices (Treg)	97
2.2.2.	Cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC).....	98
2.2.3.	Autres régulateurs.....	98
3.	Molécules de l'immunité : focus sur les chimiokines.....	99
3.1.	Superfamille des chimiokines.....	99
3.1.1.	Rôles des chimiokines.....	99
3.1.2.	Classification structurale	101
3.1.3.	Récepteurs chimiokiniques	103
3.2.	Les chimiokines dans la progression tumorale	105
3.3.	Les chimiokines et l'immunité tumorale	106
	Objectif de l'étude	108
	MATÉRIELS & MÉTHODES.....	110
I.	Étude <i>in vitro</i> de l'influence de ZO-1 cyto-nucléaire sur l'expression de l'IL-8.....	111
1.	Culture de lignées cellulaires adhérentes	111
2.	Modèle de chambre de Boyden modifiée.....	111
3.	Analyse par immunocytofluorescence	112
4.	Transfections transitoires des lignées cellulaires.....	113

4.1.	Transfection transitoire de l'ADNc de ZO-1	113
4.1.1.	Vérification de la pureté des plasmides utilisés par PCR	113
4.1.2.	Transfection transitoire d'ADNc par X-tremeGENE.....	114
4.2.	Transfection transitoire de siARN spécifique de ZO-1	114
4.2.1.	Préparation des séquences scr/siARN utilisées.....	114
4.2.2.	Transfection par précipitation au phosphate calcique.....	115
5.	Analyse de l'expression transcriptionnelle	116
5.1.	Extraction et dosage des ARN à partir de lignées cellulaires	116
5.2.	RT-qPCR	116
6.	Analyse de l'expression protéique	117
6.1.	Analyse de l'expression protéique par <i>western-blot</i> de ZO-1.....	117
6.1.1.	Extraction et dosage protéique	117
6.1.2.	<i>western-blotting</i>	117
6.1.3.	Révélation du signal protéique et analyse	118
6.2.	Analyse de l'expression de CXCL8/IL-8 par ELISA.....	119
6.2.1.	Obtention des milieux conditionnés	119
6.2.2.	Dosage de l'expression de l'IL-8 par ELISA	119
7.	Analyse de l'expression de 36 cytokines par <i>cytokine array</i>	120
II.	Étude de l'influence de ZO-1 sur le recrutement de cellules inflammatoires	121
1.	Culture de lignée cellulaire en suspension.....	121
2.	Modèle de chambre de chimiotaxie.....	121
3.	Modèle <i>in vivo</i> murin de <i>sponge assay</i>	123
3.1.	Préparation des éponges.....	123
3.2.	Opération des souris	123
3.3.	Récupération, conservation et préparation des échantillons	124
4.	Analyse des populations cellulaires recrutées	124
4.1.	Coloration au May-Grünwald-Giemsa (MGG).....	124
4.2.	Immunohistochimie (IHC).....	126
4.3.	Quantification des populations cellulaires recrutées.....	127
4.3.1.	Quantification de la densité cellulaire.....	127
4.3.2.	Quantification des IHC anti-N-élastase et anti-CD3	127
5.	Modèle <i>in vivo</i> murin de métastases	128
5.1.	Préparation des cellules	128
5.2.	Injection intraveineuse.....	128
5.3.	Récupération des poumons et broyat pulmonaire	129
5.4.	Isolation des cellules CD45+	129
5.5.	Analyse des populations cellulaires recrutées au FACS	130
5.6.	Immunomarquage anti-Ki67	132
III.	Étude <i>in vivo</i> de l'influence de ZO-1 sur l'infiltrat inflammatoire dans les CBNPC ..	133
1.	Cohorte tumorale	133
2.	Immunohistochimie manuelle	133
3.	Immunohistochimie standardisée à l'aide du Ventana.....	135
4.	Scoring des marquages.....	135
IV.	Étude du rôle de ZO-1 dans la mise en place d'un microenvironnement tumoral ..	137
1.	Analyse de l'expression cytokinique par <i>cytokine array</i>	137
1.1.	Concentration des milieux conditionnés.....	137
1.2.	Analyse de l'expression de 102 cytokines par <i>cytokine array XL</i>	137
2.	Analyse de l'expression des gélatinases.....	138
3.	Analyse de l'expression protéique par <i>western-blot</i>	139
V.	Analyses statistiques	140

RÉSULTATS.....	141
I. ZO-1 cyto-nucléaire régule l'expression de la chimiokine IL-8 dans les cellules bronchiques invasives <i>in vitro</i>.....	142
1. La localisation cyto-nucléaire de ZO-1 corrèle au potentiel invasif des cellules bronchiques humaines <i>in vitro</i>	142
2. La TEM induit une relocalisation de ZO-1 dans les cellules bronchiques épithéliales	144
3. La modulation de l'expression cyto-nucléaire de ZO-1 régule l'expression de la chimiokine IL-8 <i>in vitro</i>	145
II. La surexpression de ZO-1 favorise le recrutement de cellules inflammatoires <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	149
1. ZO-1 favorise le recrutement monocytaire <i>in vitro</i>	149
2. Les cellules invasives surexprimant ZO-1 favorisent la mise en place d'un microenvironnement pro-inflammatoire <i>in vivo</i>	150
2.1. ZO-1 favorise le recrutement de cellules inflammatoires et immunitaires <i>in vivo</i> dans un modèle murin de <i>sponge assay</i>	150
2.1.1. Comparaison des techniques de quantification cellulaire	150
2.1.2. Méthode de quantification des cellules inflammatoires	152
2.1.3. ZO-1 favorise le recrutement cellulaire à 3 et 21 jours.....	154
2.2. ZO-1 favorise le recrutement de cellules inflammatoires et immunitaires <i>in vivo</i> dans un modèle murin de <i>métastase</i>	160
III. L'inhibition de ZO-1 influence le recrutement de cellules inflammatoires	162
IV. La localisation cyto-nucléaire de ZO-1 corrèle avec un infiltrat inflammatoire accru dans les CBNPC humains.....	166
V. ZO-1 cyto-nucléaire favorise la mise en place d'un microenvironnement inflammatoire pro-tumoral.....	169
1. ZO-1 favorise la sécrétion de chimiokines pro-inflammatoires <i>in vitro</i>	169
2. ZO-1 joue un rôle dans la régulation des protéases.....	171
3. ZO-1 joue un rôle dans la régulation des protéines jonctionnelles	171
DISCUSSION	173
CONCLUSION - PERSPECTIVES	180
BIBLIOGRAPHIE	184
ANNEXE	210

Communications scientifiques

Publication scientifique

ZO-1/NF- κ B/CXCL8: A new regulatory axis for tumor angiogenesis

Lesage J., Suarez-Carmona M., Neyrinck-Leglantier D., Grelet S., Blacher S., Hunziker W., Birembaut P., Nawrocki-Raby B., Gilles C., Polette M.

The FASEB Journal, 2017 [236(4) :491-504]

Communications par voie d'affiche

ZO-1 induces a recruitment of inflammatory cells in lung cancer

Neyrinck-Leglantier D., Lesage J., Nawrocki-Raby B., Bonnomet A., Blacher S., Birembaut P., Gilles C., Polette M.

11th International Symposium on Minimal Residual Cancer (ISRMC), Corum de Montpellier, Montpellier, France (Mai 2018)

*

ZO-1: a factor able to recruit inflammatory cells in lung cancer

Neyrinck-Leglantier D., Lesage J., Nawrocki-Raby B., Bonnomet A., Blacher S., Birembaut P., Gilles C., Polette M.

8th International Meeting on EMT (TEMTIA), MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas (Décembre 2017)

*

ZO-1 induit un infiltrat inflammatoire dans les cancers pulmonaires

Neyrinck-Leglantier D., Lesage J., Nawrocki-Raby B., Bonnomet A., Birembaut P., Gilles C., Polette M.

Journée des Jeunes Chercheurs de Bichat, Bichat Doc', Université de Paris Diderot, Paris 7, France (Juin 2017)

*

ZO-1 induit le recrutement d'un infiltrat inflammatoire dans les CBP

Neyrinck-Leglantier D., Lesage J., Nawrocki-Raby B., Bonnomet A., Birembaut P., Gilles C., Polette M.

Journée des Jeunes Chercheurs de Reims, Structure Fédérative de Recherche Champagne-Ardenne-Picardie (SFR CAP-Santé), Reims, France (Mars 2017)

Communications orales

ZO-1 favorise l'établissement d'un microenvironnement inflammatoire pro-tumoral dans les cancers broncho-pulmonaires

Neyrinck-Leqlantier D., Lesage J., Nawrocki-Raby B., Bonnomet A., Blacher S., Birembaut P., Gilles C., Polette M.

11^{ème} Forum du Cancéropôle Grand-Est, Cancéropôle Grand-Est, Reims, France (Novembre 2018)

*

ZO-1 : un rôle pro-inflammatoire dans les cancers broncho-pulmonaires

Neyrinck-Leqlantier D., Lesage J., Nawrocki-Raby B., Bonnomet A., Blacher S., Birembaut P., Gilles C., Polette M.

1^{ère} journée doctorale transfrontalière (JDT), Ecole Doctorale Liège, Mons et Reims -Reims, France (Mars 2018)

*

Transition Épithélio-Mésenchymateuse & Processus Inflammatoire Pro-Métastatique

Neyrinck-Leqlantier D.

Challenge de vulgarisation scientifique « Ma thèse en 180 secondes », Université de Reims Champagne-Ardenne, Finale régionale (Mars 2016)

Distinctions scientifiques

Prix de la meilleure communication orale (Novembre 2018)

11^{ème} Forum du Cancéropôle Grand-Est, Cancéropôle Grand-Est, Reims, France

*

Prix du meilleur poster (Décembre 2017)

8th International Meeting on EMT (TEMTIA), MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas

*

Prix du meilleur poster (Juin 2017)

Journée des Jeunes Chercheurs de Bichat, Bichat Doc', Université de Paris Diderot, France

*

Prix décerné par le jury : 3^{ème} ex aequo (Mars 2016)

Challenge de vulgarisation scientifique « Ma thèse en 180 secondes », Université de Reims Champagne-Ardenne, Finale régionale

Abréviations

A

Ac	Anticorps
ADAM	<i>Disintegrin and metalloprotease</i>
ADC	Adénocarcinomes
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN codant
AF-6	<i>ALL-1 fusion partner at chromosome 6</i>
Ag	Antigène
Akt	Protein kinase-B
ALK	<i>Anaplastic lymphoma kinase</i>
Apg-2	<i>ATP and peptide-binding protein in germ cell-2</i>
ARC	Association pour la Recherche sur le Cancer
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARVCF	<i>Armadillo Repeat gene deleted in Velo-Cardio-Facial syndrome</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
αSMA	<i>α-smooth muscle actin</i>

B

BcR	<i>B-cell receptor</i>
bHLH	Hélice-boucle-hélice
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BSA	<i>Bovin Serum Albumin</i>

C

C/EBP	<i>CCAAT/Enhancer Binding Protein</i>
CAF	<i>Cancer-Associated Fibroblast</i>
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i>
CBNF	Cancer broncho-pulmonaire du non-fumeur
CBNPC	Cancers bronchiques non à petites cellules
CBPC	Cancers bronchiques à petites cellules
CCX-CKR	<i>Chemocentryx-Chemokine Receptor</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> ou Cluster de Différenciation
CD1	Gène codant pour la cycline D1
CDH1	Gène codant pour la cadhérine-E
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinase</i>
CDK4	<i>Cyclin Dependant Kinase-4</i>
CE	Carcinomes Épidermoïdes
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CIRC	Centre International de Recherche contre le Cancer

CLDN	Gène codant pour les claudines
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CSF	<i>Colony Stimulating Factor</i>
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CTCs	Cellules Tumorales Circulantes
CTL	Cellule T cytotoxique
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
CTNN	Gène codant pour les caténines
Ctrl	Contrôle
Cx	Connexine

D

DAMP	<i>Danger Associated Molecular Pattern</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phénylindole
DARC	<i>Duffy Antigen Receptor for Chemokines</i>
DC	<i>Dendritic cell</i>
Dlg-A	<i>Drosophila tumor suppressor</i>
DMEM	<i>Dubelcco's Modifier Eagle Medium</i>
DSC	Gène codant pour les desmocollines
DSG	Gène codant pour les desmoglénines
DSP	Gène codant pour les desmoplakines

E

E4-ORF1	<i>E4 open reading frame 1</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EHS	<i>Engelbrecht-Holm-Swarm</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay</i>
ELR	Motif glutamate(E)-leucine(L)-arginine(R)
EML4	<i>Echinoderm microtubule-associated protein-like 4</i>
ERCC	<i>Excision repair cross-complementation group</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>

F

FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
Foxp3	<i>Forhead box p3</i>
FSP-1	<i>Fibroblast-specific protein 1</i>
FT	Facteur de transcription
FTS	Fumée de Tabac Secondaire

G

GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Déshydrogénase
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GDP	Guanosine Di-phosphate

GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GK	<i>Guanylate kinase-like domain</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GMP	Guanosine Mono-phosphate

H

HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HAS	Haute Autorité de Santé
HER	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor</i>
HGFR	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HGFR	<i>Hepatocyte Growth Factor Receptor</i>
HRP	<i>Horse raddish peroxydase</i>
hScrib	<i>Human Scribble</i>

I

IFN	Interférons
IHC	Immunohistochimie
IL	Interleukines
INCa	Institut National du Cancer

J

JAM	<i>Junction adhesion molecule</i>
JUP	Gène codant pour les plakoglobines

K

K-RAS	<i>Homologous to Kirsten murine sarcoma virus oncogene</i>
KIR	<i>Killer-cell immunoglobulin-like receptors</i>

L

LARP	<i>Loyola's Alcohol Research Program</i>
LEF	<i>Lymphoid Enhancer Factor</i>
LB	Lymphocyte B
LT	Lymphocyte T

M

Magi	<i>MAGUK inverted protein</i>
MAGUK	<i>Membrane associated guanylate kinase homologs</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>

MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MET	Gène codant pour HGFR
MGG	May-Grünwald-Giemsa
miARN	Micro-ARN
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
MPO	Myéloperoxydase
MUPP1	<i>Multi-PDZ domain protein</i>
Mφ	Macrophages

N

NE	Élastase du neutrophile
NES	<i>Nuclear Exportation Signal</i>
NET	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NKT	<i>Natural killer T</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
NO	Monoxyde d'azote
NSE	<i>Neuron Specific Enolase</i>

O

OCLN	Gène codant pour les occludines
OMS	Organisation Mondiale de la Santé

P

PAg	Phosphoantigène
PALS1	<i>Protein associated with Lin-7</i>
PAR	<i>Partitioning-defective proteins</i>
PATJ	<i>Protein associated with tight junctions</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD-1	<i>Programmed Death-1</i>
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PDZ	Domaine d'interaction protéine-protéine
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKP	Gène codant pour les plakophilines
PR	<i>Proline rich domain</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
PSD-95	<i>Postsynaptic Density Protein</i>
PVDF	Polyvinylidene Difluoride

Q

qPCR *quantitative PCR*

R

RCPG Récepteurs couplés aux protéines G
RIPA *Radio Immuno-Precipitation Assay buffer*
RT *Reverse Transcription*

S

SAF-B *Scaffold attachment factor-B*
SC-35 *Splicing Component-35*
SDS Sodium Dodecyl Sulfate
SH3 *Scr homology3 domain*
siRNA *Small interfering Ribonucleic Acid*
SNP *Single Nucleotide Polymorphism*
SVF Sérum de Veau Fœtal

T

TAM *Tumor-associated macrophage*
TAN *Tumor-associated neutrophil*
TCF *T-Cell Factor*
TcR *T-cell receptor*
TEM Transition Épithélio-Mésenchymateuse
TGF *Transforming Growth Factor*
Th *T helper cell ; cellule T auxiliaire*
TIL *Tumor-associated lymphocyte*
TMB Tetramethylbenzidine
TME Transition Mésenchymo-Épithéliale
TNF *Tumor Necrosis Factor*
TNM *Tumor Node Metastasis*
Treg Cellule T régulatrice

U

U1-6 *Unique variable domains*

V

VEGF *Vascular Endothelial Growth Factor*

W

WHO *World Health Organisation*

X

XRCC *X-ray repair cross-complementing protein*

Y

YAP *Yes kinase-Associated Protein*

Z

ZAK *ZO-1 associated kinase*

ZEB *Zinc-finger E-box Binding factor*

ZO *Zonula Occludens*

ZONAB *ZO-1 Associated Nucleic Acid Binding protein*

ZU5 *Unc5-like receptors*

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie, histologie et physiologie du poumon humain _____	26
Figure 2 : Incidence et mortalité des cancers selon le sexe en France métropolitaine en 2017 _____	29
Figure 3 : Les risques, la prévention des risques, le diagnostic et les thérapies du CBP _____	35
Figure 4 : Classification histopathologique des carcinomes broncho-pulmonaires _____	36
Figure 5 : Classification moléculaire des CBNPC _____	45
Figure 6 : Propriétés fondamentales des cellules tumorales _____	54
Figure 7 : Les étapes de la progression tumorale _____	56
Figure 8 : Les différents types de TEM _____	58
Figure 9 : Les trois phases phénotypiques majeures de la TEM _____	60
Figure 10 : Les différentes jonctions intercellulaires épithéliales _____	65
Figure 11 : Les composant du cytosquelette et de leur distribution cellulaire _____	66
Figure 12 : Les structures en domaine des ZO et des partenaires protéiques associés _____	77
Figure 13 : Les cellules de l'immunité innée et acquise _____	85
Figure 14 : Le microenvironnement immunitaire pro-tumoral _____	96
Figure 15 : La classification structurale des chimiokines _____	102
Figure 16 : Les récepteurs des chimiokines et leurs ligands potentiels _____	104
Figure 17 : Schématisation du principe de la technique du « sandwich ELISA » _____	119
Figure 18 : Schématisation du protocole de transmigration de la lignée monocyttaire THP-1 utilisé _____	122
Figure 19 : Schématisation du protocole de <i>sponge assay</i> utilisé _____	125
Figure 20 : Schématisation du protocole <i>in vivo</i> murin de métastases _____	131
Figure 21 : Étude de la localisation de ZO-1 dans un panel de lignées bronchiques humaines _____	142
Figure 22 : Validation de la localisation cyto-nucléaire de ZO-1 dans la lignée invasive Beas-2B _____	143
Figure 23 : Analyse de la plasticité des lignées invasives Beas-2B et BZR à confluence _____	143
Figure 24 : Analyse de la délocalisation de ZO-1 dans les cellules A549 induites en TEM _____	144
Figure 25 : Analyse de la modulation de l'expression de ZO-1 dans les cellules Beas-2B et BZR _____	146
Figure 26 : Analyse de l'expression cytokinique des cellules Beas-2B par <i>cytokine array</i> _____	147
Figure 27 : Analyse de la modulation de ZO-1 sur l'expression de l'IL-8 dans les lignées Beas-2B et BZR _____	148
Figure 28 : Étude du pouvoir chimiotactique de ZO-1 dans les cellules Beas-2B <i>in vitro</i> _____	149
Figure 29 : Méthode de quantification automatique par nombre de cellules _____	151
Figure 30 : Méthode de quantification automatique par densité de cellules marquées _____	151
Figure 31 : Méthode de quantification automatique de la densité de cellules immunomarquées _____	152
Figure 32 : Superposition des images binarisées de la densité de cellules immunomarquées _____	153
Figure 33 : Analyse de l'effet des milieux conditionnés de cellules Beas-2B surexprimant ZO-1 sur le recrutement cellulaire à 3 et 21 jours <i>in vivo</i> _____	154
Figure 34 : Analyse des populations inflammatoires recrutées au sein des éponges à 3 jours _____	155

Figure 35 : Analyse de l'effet des milieux conditionnés de cellules Beas-2B surexprimant ZO-1 sur le recrutement de granulocytes polynucléaires neutrophiles à 3 jours <i>in vivo</i>	156
Figure 36 : Analyse de l'effet des milieux conditionnés de cellules Beas-2B surexprimant ZO-1 sur le recrutement de lymphocytes T à 3 jours <i>in vivo</i>	157
Figure 37 : Analyse de l'effet des milieux conditionnés de cellules Beas-2B surexprimant ZO-1 sur le recrutement de neutrophiles à 21 jours <i>in vivo</i>	158
Figure 38 : Analyse de l'effet des milieux conditionnés de cellules Beas-2B surexprimant ZO-1 sur le recrutement de lymphocytes T à 21 jours <i>in vivo</i>	159
Figure 39 : Analyse de l'effet de l'injection en IV de cellules Beas-2B surexprimant ZO-1 sur le recrutement de cellules inflammatoires au niveau pulmonaire <i>in vivo</i>	161
Figure 40 : Étude du pouvoir chimiotactique des cellules Beas-2B et BZR siZO-1 <i>in vitro</i>	162
Figure 41 : Analyse de l'effet des milieux conditionnés de cellules Beas-2B et BZR dont l'expression de ZO-1 est inhibée sur le recrutement cellulaire à 6 et 21 jours <i>in vivo</i>	164
Figure 42 : Analyse de l'effet de l'injection en IV de cellules Beas-2B avec une expression de ZO-1 inhibée sur le recrutement de cellules inflammatoires au niveau pulmonaire <i>in vivo</i>	165
Figure 43 : Corrélation inverse de l'expression cyto-nucléaire et membranaire de ZO-1	166
Figure 44 : Étude IHC de la corrélation de ZO-1 cyto-nucléaire avec l'infiltrat inflammatoire dans les tumeurs bronchiques humaines	167
Figure 45 : Étude IHC de la corrélation de ZO-1 cyto-nucléaire avec l'expression de marqueurs d'immunosuppression dans les tumeurs bronchiques humaines	168
Figure 46 : Analyse de l'expression cytokinique des cellules Beas-2B en fonction la modulation d'expression de ZO-1 par <i>cytokine array</i>	170
Figure 47 : Effet de la modulation de ZO-1 sur l'expression des protéases	171
Figure 48 : Effet de la modulation de ZO-1 sur l'expression des protéines jonctionnelles	172
Figure 49 : Schéma récapitulatif du rôle de ZO-1 cyto-nucléaire dans la mise en place d'un microenvironnement pro-inflammatoire/immunitaire tumoral	181

Liste des tableaux

Tableau 1 : Étude PETRI de la survie relative à 5 ans et du diagnostic selon le stade des CBP _____	30
Tableau 2 : Programme SEER de la survie relative à 5 ans et du diagnostic selon la localisation des CBP _____	30
Tableau 3 : Classification TNM des CBNPC (8 ^{ème} édition, 2017) _____	40
Tableau 4 : Les différents stades des CBNPC selon la classification TNM _____	41
Tableau 5 : Illustration des différents stades de la classification TNM _____	42
Tableau 6 : Les biomarqueurs de la TEM _____	60
Tableau 7 : Régulation des protéines par les trois familles de FT de la TEM _____	69
Tableau 8 : Les séquences d'interaction des domaines PDZ _____	74
Tableau 9 : Régulation des protéines ZO dans les carcinomes humains _____	82
Tableau 10 : Caractéristiques majeures des cellules de l'immunité _____	95
Tableau 11 : Nomenclature officielle des chimiokines et leurs noms alternatifs _____	100
Tableau 12 : Séquences des petits ARN interférents (siRNA) ZO-1 utilisés _____	115
Tableau 13 : Séquences nucléotidiques utilisées en RT-qPCR _____	116
Tableau 14 : Liste des anticorps utilisés pour les IHC <i>sponge assay</i> _____	126
Tableau 15 : Liste des anticorps utilisés au FACS _____	130
Tableau 16 : Cohorte des 42 échantillons de patients atteints de CBNPC utilisée _____	133
Tableau 17 : Liste des anticorps utilisés pour les IHC sur les coupes humaines CBNPC _____	134
Tableau 18 : Liste des anticorps utilisés en <i>western-blotting</i> _____	139

INTRODUCTION

PARTIE I

Cancer du poumon

I. Cancer du poumon

1. Anatomie, histologie et fonctions physiologiques du poumon

1.1. Anatomie et histologie broncho-pulmonaire

Le poumon, principal organe de l'appareil respiratoire, se situe dans la cage thoracique des voies aériennes inférieures et repose sur le diaphragme. Les poumons, entourés de la paroi thoracique, se divisent en poumons polylobés droit et gauche, protégés par une membrane appelée la plèvre, et constitués respectivement de trois lobes à droite pour seulement deux à gauche laissant ainsi place au cœur. Les différents lobes sont séparés par des scissures pulmonaires et chaque poumon est relié à la trachée, organe par lequel l'air va transiter.

L'appareil broncho-pulmonaire regroupe l'arbre bronchique, qui s'étend de la trachée à la bronchiole, et le lobule pulmonaire, qui s'étend de la bronchiole terminale jusqu'aux lobules. L'arbre bronchique se divise de façon dichotomique en deux bronches principales qui se segmentent par la suite en bronches de plus en plus petites, dites lobaires, segmentaires puis en bronchioles. Les bronchioles terminales se subdivisent par la suite en bronchioles respiratoires qui conduisent aux sacs alvéolaires contenant les alvéoles, petites poches dans lesquelles se déroulent les échanges gazeux air/sang. Le lobule pulmonaire, aussi appelé poumon périphérique, est donc à l'origine de 3 à 30 unités fonctionnelles respiratoires, les acini. L'acinus, du latin « *grain de raisin* », fait référence aux sacs alvéolaires prenant la forme de grappe d'environ 100 μm de diamètre (**Figure 1**).

D'un point de vue macroscopique, le tissu pulmonaire est qualifié de spongieux, élastique et homogène. Cependant, l'histologie des différents revêtements pulmonaires change au fur et à mesure de l'arbre bronchique. En effet, la trachée et les bronches sont composées d'un épithélium pseudostratifié cilié, présentant des cellules caliciformes productrices de mucus au niveau de la muqueuse et sous-muqueuse, et de tissu conjonctif. Ces structures assurent leur rigidité grâce au cartilage, à l'inverse des bronchioles qui en contiennent de moins en moins.

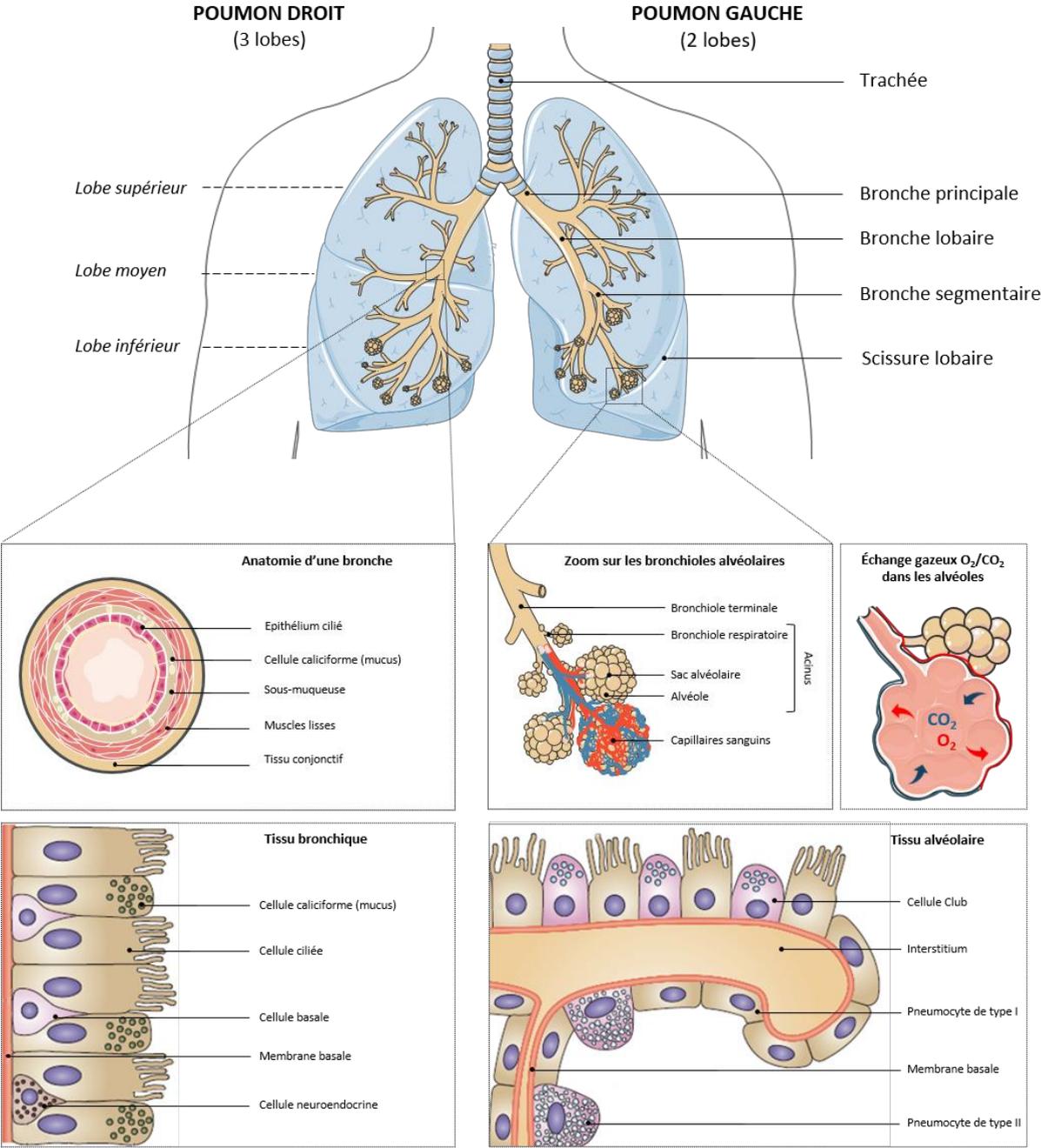


Figure 1 : Anatomie, histologie et physiologie du poumon humain

Schéma modifié d'après (Sun, Schiller, and Gazdar 2007)

L'épithélium bronchiolaire est constitué de cellules détoxifiantes, de cellules clubs (anciennement appelées cellules de Clara), et de muscles lisses en forme d'anneau facilitant le contrôle du diamètre des bronchioles pour les phénomènes de bronchoconstriction ou bronchodilatation. Les alvéoles pulmonaires, quant-à-elles, sont composées d'une seule et unique couche fine perméable de cellules épithéliales dans laquelle on retrouve des pneumocytes de type I, principales cellules de recouvrement, et des pneumocytes de type II, productrices du surfactant tensioactif¹. Les ganglions lymphatiques, localisés dans diverses régions pulmonaires², permettent également d'évacuer le liquide produit naturellement au niveau des poumons. D'autres cellules peuvent border les alvéoles tels que les macrophages alvéolaires, les lymphocytes ou encore les plasmocytes. De petits vaisseaux sanguins appelés capillaires sont également présents autour des alvéoles, permettant d'effectuer la fonction respiratoire (Martini, Timmons, and Tallitsch 2012).

1.2. Physiologie broncho-pulmonaire

Les cellules pulmonaires ont pour fonction principale de respirer c'est-à-dire d'effectuer des échanges gazeux de dioxygène (O₂) et de dioxyde de carbone (CO₂) avec le milieu extérieur au niveau des structures pulmonaires les plus profondes, les alvéoles. La circulation pulmonaire permet d'enrichir le sang non hématosé, qui provient des tissus, en O₂. Le sang nouvellement hématosé est ensuite réacheminé dans les tissus jusqu'au cœur par les veines pulmonaires. Ainsi, l'ensemble des cellules de l'organisme reçoit continuellement de l'O₂, molécule présente dans l'air et transférée dans le sang par les alvéoles. A l'inverse, le CO₂ produit par les déchets cellulaires est toxique pour l'organisme et est immédiatement évacué dans l'air par les alvéoles (**Figure 1**).

L'appareil respiratoire a pour seconde fonction d'assurer le maintien de la qualité de l'air au niveau des alvéoles pulmonaires en limitant les contaminants inhalés par l'air ambiant par l'intervention de cellules muco-sécrétrices ciliées. En effet, au sein de la muqueuse trachéo-bronchique, le mucus et les cils permettent de purifier les voies respiratoires qui peuvent être

¹ Le surfactant pulmonaire est un liquide, constitué de matières grasses et de protéine, qui permet de réduire la tension superficielle des alvéoles tout en facilitant la compliance pulmonaire

² Il existe quatre types de ganglions lymphatiques au niveau des poumons : les ganglions hilaires situés au niveau du hile pulmonaire, les ganglions médiastaux situés dans la région du médiastin entre les deux poumons, les ganglions sous-carénaux dans la région de séparation de la trachée en bronches souches et les ganglions bronchiques qui bordent les bronches souches.

contaminées par des substances délétères pour l'organisme telles que la fumée, la pollution, les bactéries ou encore les virus (American Cancer Society 2012, Martini, Timmons, and Tallitsch 2012). D'un point de vue physiologique, le poumon est un organe fonctionnel indispensable pour la survie de l'organisme, rendant ainsi la pathogénicité de cet organe très vite alarmante.

2. Epidémiologie et étiologie des cancers pulmonaires

2.1. Incidence et mortalité

2.1.1. Dans le monde

Depuis plus d'une dizaine d'années, bien que les types de cancers varient entre les hommes et les femmes, le plus fréquemment diagnostiqué et surtout le plus meurtrier reste le cancer du poumon. En effet, selon le projet mondial GLOBOCAN 2012, le nombre de nouveaux cas de cancer est estimé à 14,1 millions avec 1,8 million pour le cancer du poumon soit 13% au total (Mao *et al.* 2016, Torre *et al.* 2015, CIRC 2013). Les dernières données statistiques de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estiment également jusqu'à 8,2 millions de décès par cancer en 2012, autrement dit, 1 décès sur 6 dans le monde est dû au cancer. Parmi eux, les cancers broncho-pulmonaires (CBP) sont responsables de 1,69 million de décès par cancer soit près de 20% des décès par cancer au niveau mondial (OMS 2018a).

2.1.2. En France

Depuis une quarantaine d'années, en France, l'incidence globale du cancer ne cesse d'augmenter. En effet, bien que l'incidence chez les femmes reste plus faible que chez les hommes, le taux d'incidence standardisé chez la femme croît de 5,3% par an entre 1980 et 2012 contre 0,1% par an chez l'homme (Binder-Foucard *et al.* 2013). Selon les dernières projections 2017 de l'Institut National du Cancer, le cancer du poumon pourra toucher jusqu'à 49 000 nouveaux cas sur 400 000 estimés au total. La hausse de l'incidence pour ce cancer conduit également à un fort taux de mortalité. En effet, à l'échelle nationale, le cancer du poumon reste le plus mortel avec plus de 30 000 décès sur 150 000 décès par cancer tous sexes confondus projetés en 2017 (Jéhannin-Ligier *et al.* 2017) (**Figure 2**).

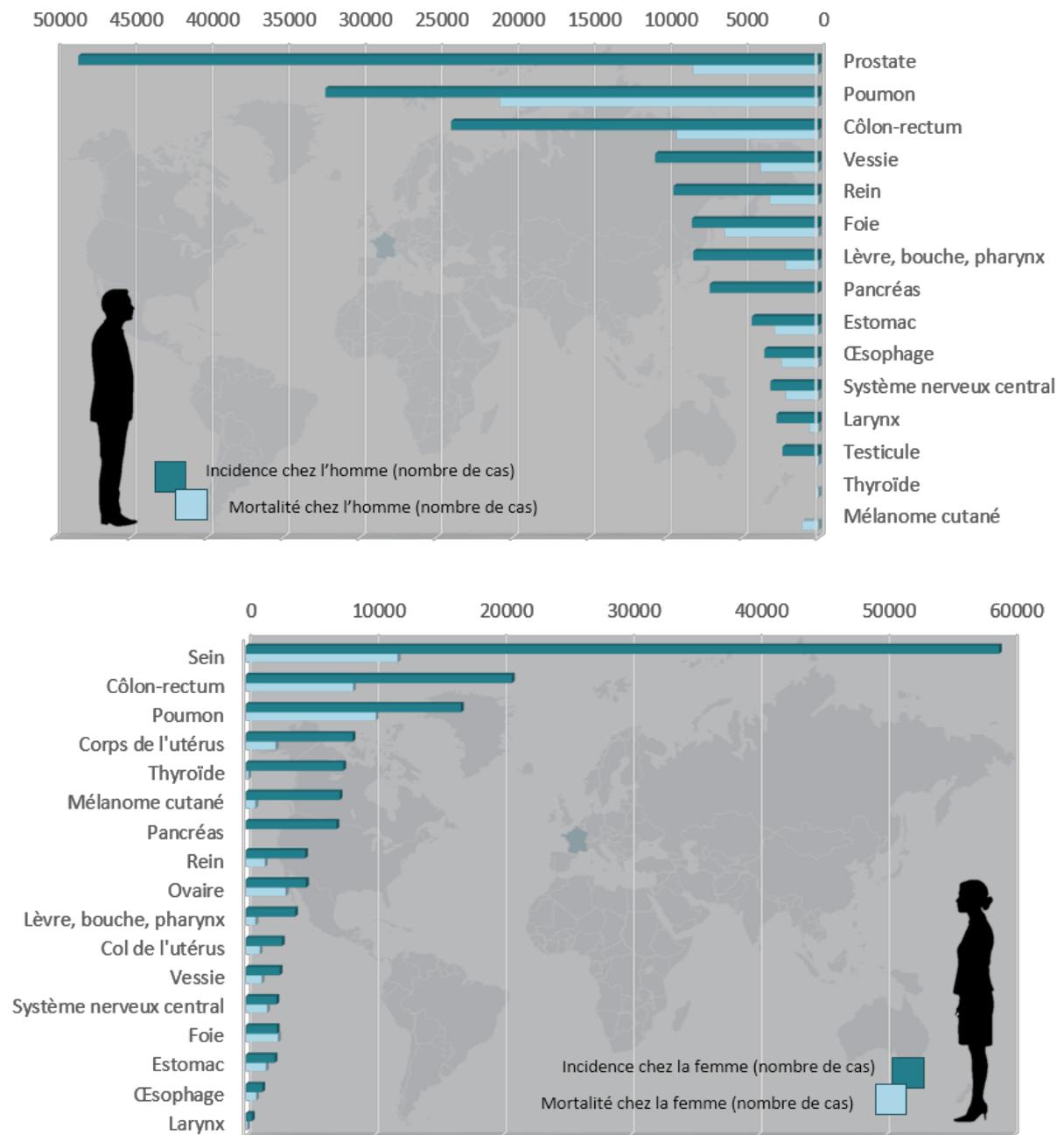


Figure 2 : Incidence et mortalité des cancers selon le sexe en France métropolitaine en 2017

Illustration réalisée à partir des données statistiques des projections pour 2017 établies par l'Institut National du Cancer (Projections d'incidence et de mortalité des cancers en 2017 – janvier 2018). L'axe des abscisses est exprimé en nombre de cas, l'incidence et la mortalité sont représentées respectivement par les barres foncées et les barres claires.

Même si l'avancée des thérapies actuelles permet de réduire légèrement le taux de mortalité par cancer, la survie nette globale à 5 et 10 ans est encore faible et diminue avec l'âge. En effet, en 2015, la survie nette à 5 ans passe de 25% chez les 15-44 ans à 10% chez les 75 ans et plus, en sachant que l'âge médian au diagnostic est d'environ 65 ans (Cowppli-Bony *et al.* 2017). Le diagnostic représente également une part importante du pourcentage de survie des patients. En effet, selon l'étude PETRI (Pepin 2006) et le programme SEER (NCI 2005), un diagnostic tardif conduit souvent à un stade trop avancé associé à la dissémination métastatique de ce cancer, limitant ainsi le pourcentage de survie (**Tableaux 1 & 2**).

Stade	Survie relative à 5 ans (%)	Répartition des diagnostics (%)
Stade I	47	15,5
Stade II	32	13,6
Stade III	22	20,0
Stade IV	5	39,4
Inconnu	ND	11,5
Tous stades	22	100

Tableau 1 : Étude PETRI de la survie relative à 5 ans et du diagnostic selon le stade des CBP

L'étude **PETRI** réalisée par l'association **Prévention et Épidémiologie des Tumeurs en Région Ile-de-France** a permis un suivi de la survie des patients atteints d'un cancer broncho-pulmonaire en fonction du stade sur une cohorte de 1994 à 1999 déclarée en Ile-de-France.

Stade	Survie relative à 5 ans (%)	Répartition des diagnostics (%)
Localisé	52,6	15
Régional	23,7	22
A distance	3,5	55
Non déterminé	8,5	8
Tous stades	15,6	100

Tableau 2 : Programme SEER de la survie relative à 5 ans et du diagnostic selon la localisation des CBP

Le programme de **Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER)** est une source d'information épidémiologique sur l'incidence et la survie des cancers aux Etats-Unis. Les tableaux sont établis à partir des données statistiques sur une cohorte de 1999 à 2005 dans le rapport de l'INCa (INCa 2010b).

2.2. Facteurs de risques externes et internes

2.2.1. Tabagisme, Drogue et Alcool

Les facteurs de risques de développer un cancer du poumon sont nombreux et variés mais le principal reste, de loin, le tabagisme (Dela Cruz, Tanoue, and Matthay 2011, Gandini *et al.* 2008). Qu'il soit actif ou passif, le **tabagisme** représente un problème de santé publique majeur puisqu'il est responsable, à lui seul, de 81% des décès liés à ce cancer en France, soit 8 cancers sur 10 (INCa 2011a) (**Figure 3**). En effet, la fumée de tabac est constituée de près de 4000 substances chimiques parmi lesquelles 250 sont nocives pour la santé et 50 sont cancérogènes (Gupta *et al.* 2009, IARC 2004). Plus précisément, la fumée de cigarette contient des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), qui, en interagissant avec l'ADN des fumeurs, sont à l'origine de mutations de l'ADN sous forme carcinogène (Geneste *et al.* 1991, Los Alamos National 2016). L'impact tabagique lié au développement d'un cancer dépend aussi bien de la durée, de la quantité consommée, que de l'âge de début du **tabagisme actif**. Il s'avère d'ailleurs qu'un fumeur multiplie par 10 à 15 fois les « chances » de développer un cancer (OMS 2018b). Et, bien que le risque diminue progressivement lorsque la consommation de cigarettes est interrompue, il reste néanmoins supérieur à celui d'un non-fumeur perpétuel (Pesch *et al.* 2012). Les fumeurs de pipe, de cigares et de cigarettes à faible teneur en goudron ou en nicotine ne sont pas pour autant épargnés et sont aussi capables d'engendrer un cancer.

De même, si le **tabagisme passif** est, quant à lui, involontairement provoqué chez un non-fumeur continuellement exposé à la fumée de cigarette dans l'environnement, il n'en est pas moins négligeable. En effet, bien que le niveau d'exposition à de la fumée de tabac secondaire (FTS) soit logiquement bien moindre que chez le fumeur actif, le risque est tout de même multiplié par 1,2, soit une augmentation de 26%, chez un fumeur passif (INCa 2010a). Une méta-analyse du Centre International de Recherche contre le Cancer (CIRC) en 2004 a également mis en évidence un impact incontestable de l'inhalation de FTS, dont les particules sont plus petites et donc plus pénétrantes dans les voies respiratoires. En effet, en France, la fumée secondaire a provoqué la mort de 253 non-fumeurs en 2000. Plus de 50 études épidémiologiques à ce sujet ont d'ailleurs conduit à une sensibilisation de la fonction publique sur le taux de mortalité infligé par la FTS qui s'est traduit par la mise en place, le 1^{er} février

2007, de l'interdiction de fumer dans les lieux publics. Cette première mesure pour protéger les fumeurs passifs, a permis de réduire la consommation de cigarettes de façon quotidienne mais pourrait bien conduire à une augmentation de fumeurs à leur domicile (INCa 2010a). Une étude américaine a d'ailleurs rapporté que 9 millions de jeunes enfants américains âgés de moins de 5 ans sont sujets au tabagisme passif (American Cancer Society 2008). Dans ce sens, un second dispositif, qui a connu son essor face au tabac en 2013, est celui de la **cigarette électronique**. Autrement appelée l'e-cigarette ou encore la « vapoteuse », cette dernière produit de la fumée sans odeur et limite l'inhalation de substances cancérigènes et addictives associées au tabac qui aurait permis à de nombreux fumeurs de réduire voire même, pour 1/3, d'arrêter leur consommation de cigarettes. L'utilisation de la cigarette électronique comme « sevrage tabagique » reste néanmoins très controversée par la présence non négligeable de nicotine, substance à l'origine d'une dépendance (Masiero *et al.* 2018).

De façon similaire à la consommation tabagique, celle du **cannabis** est aussi corrélée à un fort potentiel à risque de développer un cancer broncho-pulmonaire (CBP). Selon l'étude Aldington de 2008, la consommation de cannabis chez les utilisateurs fréquents (supérieur à 10 joint-année) multiplie de 5,7 fois le risque comparé à un non-fumeur (Aldington *et al.* 2008). En effet, l'inhalation du cannabis est d'autant plus dangereuse que les joints de cannabis sont généralement inhalés plus profondément sans filtre, et sont deux fois plus concentrés en substances toxiques que les cigarettes (Wu *et al.* 1988).

Un autre facteur de risque tout aussi avéré de tous les cancers est celui de l'**alcool**. Cependant, jusqu'à présent, aucune corrélation directe n'a pu être mise en évidence avec le cancer du poumon. Toutefois, une récente étude du *Loyola's Alcohol Research Program* (LARP) a montré une diminution significative de la production de monoxyde d'azote (NO) chez les grands buveurs comparés à ceux qui ne consomment pas d'alcool (Afshar *et al.* 2016). La faible teneur en NO chez les sur-consommateurs d'alcool conduirait donc à une insuffisance du système immunitaire qui favoriserait le développement de maladies chroniques inflammatoires potentiellement au niveau des voies aériennes (Perrot 2016). Toutefois, une chose est certaine, c'est que l'association de l'alcool et/ou du cannabis avec la consommation de tabac conduit à une augmentation indéniable des facteurs cancérigènes.

2.2.2. Expositions professionnelles et environnementales

Les facteurs extérieurs, aussi bien professionnels qu'environnementaux, contribuent également en majorité à augmenter le risque des cancers et en particulier celui du poumon.

La fumée de combustibles est à l'origine de nombreuses **émissions de gaz** tels que le dioxyde de soufre, le monoxyde et dioxyde de carbone ou encore le monoxyde d'azote, qui peuvent être à l'origine de diverses pathologies respiratoires au niveau mondial. Depuis 2012, le CIRC a également classé les particules émises par les moteurs de diesels comme agents cancérigènes du groupe 1, autrement dit, les plus dangereux. L'exposition domestique, quant à elle, est liée à l'utilisation de charbon pour le chauffage et la cuisine au sein des foyers et à la présence naturelle de radon au sein des habitations (Field and Withers 2012). Le radon, gaz incolore et inodore est d'ailleurs, à lui seul, à l'origine de 5 à 12% des décès par cancer du poumon et représente donc la deuxième cause de cancers broncho-pulmonaires en France (INCa 2011b) (**Figure 3**).

De plus, au-delà de l'exposition environnementale, certaines personnes sont exposées à des substances cancérigènes au sein de leur travail. En effet, 15% des cancers broncho-pulmonaires auraient une **origine professionnelle** selon l'Institut National de Recherche et de Sécurité. L'exposition à l'amiante est la plus connue mais les produits cancérigènes sont multiples dans le monde professionnel. Ce sont notamment les goudrons, les rayonnements ionisants, les huiles de houille ou plus communément le charbon à usage professionnel et certains métaux (arsenic, chrome, nickel...) (INCa 2011b, Unité cancer et environnement 2016). L'évolution régulière de la connaissance d'un cancer d'origine professionnelle permet une indemnisation supplémentaire non négligeable pour les patients et améliore les efforts de prévention et de conscience des risques au sein des entreprises.

2.2.3. Prédispositions génétiques

Bien que le tabac soit la cause principale des cancers pulmonaires, tous les fumeurs ne vont pas pour autant développer un CBP. *A contrario*, environ 25% des cas de cancer du poumon se déclenchent chez des patients n'ayant jamais fumé. Les statistiques globales estiment les cas non-fumeurs à 15% chez l'homme et jusqu'à 53% chez la femme, suggérant un rôle des facteurs hormonaux dans la carcinogenèse pulmonaire (Sun, Schiller, and Gazdar 2007). Ainsi,

le cancer broncho-pulmonaire du non-fumeur (CBNF) se caractérise bien souvent par des mutations génétiques spécifiques parfois héréditaires (Kim and Westeel 2013) (**Figure 3**).

En effet, même si les **facteurs de risques héréditaires** du cancer du poumon sont complexes et ignorés face à la multitude d'autres facteurs importants comme le tabac par exemple, ils n'en sont pas moins négligeables. Le cancer peut donc également être « familial » lorsqu'il est caractérisé par des mutations géniques héréditaires, c'est-à-dire transmises par l'un ou plusieurs des parents diagnostiqué(s) pour le même cancer. En effet, environ 8% des cancers du poumon sont le résultat de prédispositions génétiques (Liu *et al.* 2008) et plusieurs études ont mis en évidence une sensibilité 2 à 3 fois plus importante chez les personnes présentant des antécédents familiaux (Coté, *et al.* 2012, Iyevleva and Imyanitov 2016). Des études pangénomiques à partir de puces SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) ont d'ailleurs permis d'identifier des **polymorphismes nucléotidiques** à l'origine d'une sensibilité plus importante de développer un cancer broncho-pulmonaire (Christiani 2009, Janne *et al.* 2004, Yokota, Shiraishi, and Kohno 2010). Parmi eux, les polymorphismes des gènes CHRNA3, CHRNA5 et CHRNB4 du locus 15p25.1, qui codent pour les sous-unités respectives $\alpha 3$, $\alpha 5$ et $\beta 4$ des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine, sont associés à une augmentation du risque de dépendance à la nicotine et au développement tumoral pulmonaire (Amos *et al.* 2008, Brennan, Hainaut, and Boffetta 2011, Hung *et al.* 2008).

Par ailleurs, le polymorphisme des gènes codant pour les enzymes métaboliques du cytochrome P450 1A1 tel que CYP1A1, dont le variant Ile(462)Val contribue également à la carcinogénèse pulmonaire (Hung *et al.* 2003). De plus, les polymorphismes des gènes impliqués dans les enzymes de réparation de l'ADN tel que XRCC1 pour l'excision des bases, ERCC1 pour l'excision de nucléotide et XRCC3 pour les cassures double-brins sont corrélés à un risque tumoral pulmonaire important (Dela Cruz, Tanoue, and Matthay 2011). Des **mutations génétiques** sont aussi à l'origine d'une transmission germinale telle que la mutation du gène de l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) à l'origine du variant EGFR T790M (Kanwal, Ding, and Cao 2017) (section Intro - I.4.2.2).

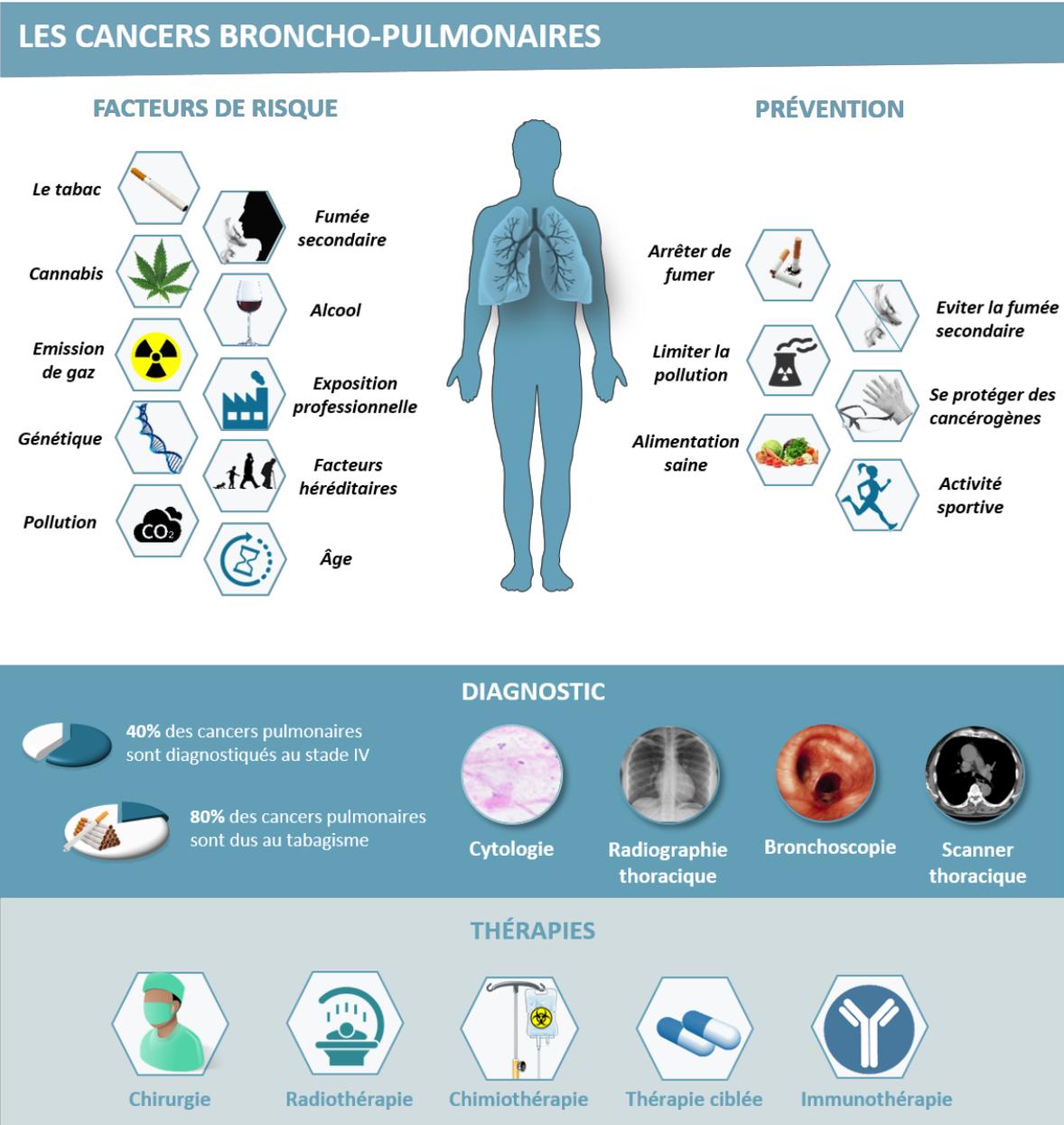


Figure 3 : Les risques, la prévention des risques, le diagnostic et les thérapies du CBP

Bien souvent, ces modifications génétiques apparaissent plus fréquemment chez les personnes non-fumeuses et constituent une meilleure compréhension des disparités individuelles associées au cancer bronchique, indépendamment du facteur tabagique. Cette hétérogénéité des cancers, notamment en fonction du type, a fait l'objet de classifications histopathologiques bien précises.

3. Classification histopathologique des cancers pulmonaires

La terminologie associée aux cancers fait référence à l'origine histologique du cancer. En effet, la grande majorité des cancers broncho-pulmonaires se développe à partir de l'épithélium tandis que les autres types histologiques représentent moins de 1% des cas. Ces tumeurs d'origine épithéliales, sont qualifiées de **carcinomes** et peuvent se développer au niveau de toutes les structures histologiques des voies respiratoires, aussi bien profondes que de surface, comme les bronches, les bronchioles ou encore les alvéoles pulmonaires. Selon l'OMS, l'examen anatomopathologique de la taille et de l'aspect des cellules permet de distinguer deux types histologiques de carcinomes pulmonaires : les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC) et les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC). D'un point de vue histologique, ces cancers sont différents car l'origine des cellules dont ils sont issus diffère. L'analyse du type de carcinome développé, par biopsie ou par pièce de résection tumorale, permet de statuer sur la stratégie thérapeutique à adopter, tout comme l'importance de déterminer le stade d'évolution de la tumeur (Travis *et al.* 2015, Chater 2014) (**Figure 4**).

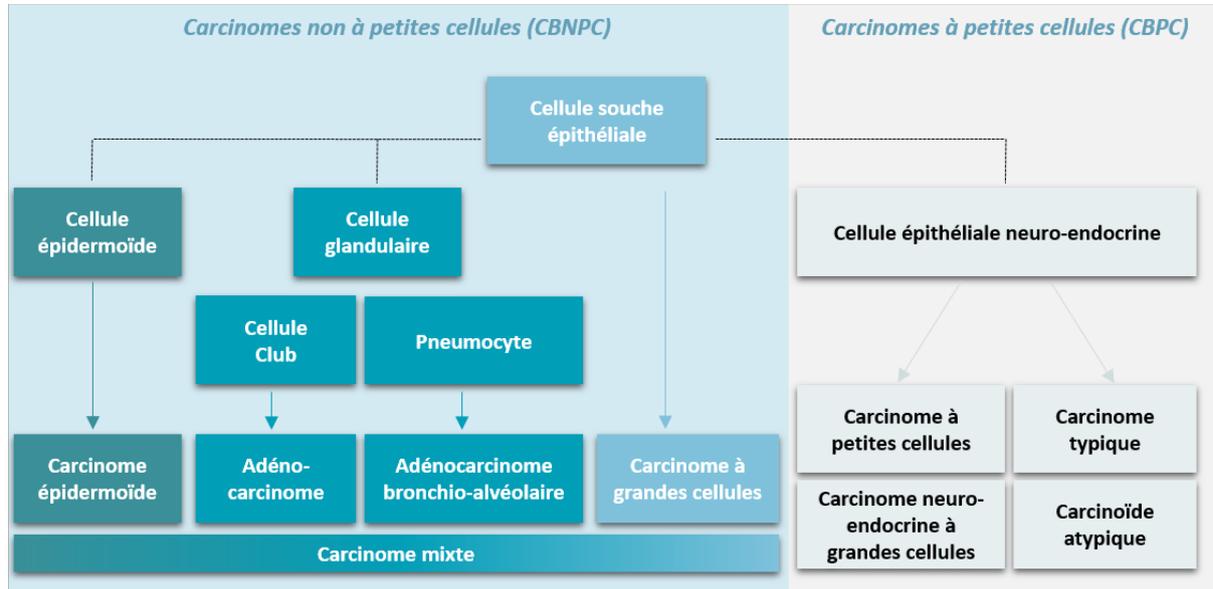


Figure 4 : Classification histopathologique des carcinomes broncho-pulmonaires

3.1. Carcinomes à petites cellules (CBPC)

Parmi les carcinomes bronchiques, les CBPC représentent 15% de leur ensemble et sont associés à un fort taux tabagique. Ces carcinomes, d'origine neuroendocrinienne, sont particulièrement invasifs, aussi bien localement qu'à distance, et s'accompagnent souvent de syndromes paranéoplasiques endocriniens³. En France, les CBPC représentent environ 5 000 nouveaux cas par an dont 2/3 sont diagnostiqués métastasés dès la première détection. Même si ces cancers sont plus sensibles à la chimiothérapie et à la radiothérapie que les CBNPC, le taux de survie à 5 ans reste très faible, de l'ordre de 3%. D'un point de vue macroscopique, ces tumeurs se développent de façon proximale, notamment au niveau du hile pulmonaire des bronches principales. Histologiquement parlant, ces carcinomes se caractérisent par de petites cellules dont le rapport cytoplasme/noyau est faible comparé aux CBNPC. La classification des CBPC regroupe les cellules neuroendocrines, les cancers neuroendocrines à grandes cellules et les carcinoïdes typiques ou atypiques (diffèrent en fonction de la présence ou non de nécrose et de pléomorphisme des noyaux). La mise en évidence de la différenciation neuro-endocrine repose sur la détection positive de l'expression de la *Neuron Specific Enolase* (NSE) par immunohistochimie. Le stade d'évolution de ces cancers n'est pas soumis à la classification TNM (section Intro – I.3.3) comme les CBNPC et repose sur deux stades : l'un est limité au thorax (1/3 des cas) tandis que l'autre est disséminé (2/3 des cas).

3.2. Carcinomes non à petites cellules (CBNPC)

Les CBNPC tiennent leur nom de leur aspect cellulaire « non de petite taille » contrairement aux CBPC et représentent la grande majorité des cancers bronchiques avec 85% des cas. Ils peuvent se développer dans l'ensemble des tissus qui tapissent les voies aériennes pulmonaires permettant une distinction de 3 grands types de CBNPC. Leur taux de survie à 5 ans, tout comme les CBPC, reste faible avec 10%.

³ Il s'agit de maladies systémiques qui se manifestent par des troubles neurologiques, endocriniens, hématologiques, dermatologiques, osseux ou articulaires

3.2.1. Carcinomes épidermoïdes (CE)

Les carcinomes épidermoïdes sont retrouvés dans 35% des cancers pulmonaires et sont plus souvent développés chez l'homme et majoritairement chez les fumeurs (Sun, Schiller, and Gazdar 2007). Ces cancers tiennent généralement leur origine au niveau des bronches à partir desquelles ils forment une métaplasie malpighienne caractérisée par un épithélium pavimenteux stratifié de cellules caliciformes et ciliées. Similairement à la morphologie des cellules malpighiennes, ces cellules tumorales épidermoïdes présentent des foyers de kératinisation et/ou la présence de ponts d'union intercellulaires. En fonction du degré de différenciation, les tumeurs bien, moyennement et peu différenciées se distinguent respectivement par leur forte, faible et absence de kératinisation. Trois sous-types de cancers épidermoïdes existent : basaloïde, non-kératinisé et kératinisé. Lorsque la morphologie de la tumeur ne permet pas d'établir la classification précise des carcinomes épidermoïdes, l'expression du marqueur épidermoïde p40 et des cytokératines 5 et 6 est recherchée.

3.2.2. Adénocarcinomes (ADC)

Les adénocarcinomes sont les cancers bronchiques les plus fréquemment diagnostiqués avec 40% des cas. Ces tumeurs, majoritairement développées chez la femme et plus fréquemment chez les non-fumeurs, adoptent un aspect glandulaire (d'où provient leur patronyme « *adéno* ») ou muco-sécrétoire et se développent à partir des bronchioles périphériques (Sun, Schiller, and Gazdar 2007). Il existe cinq sous-types d'adénocarcinomes qui diffèrent selon la forme que prennent les cellules tumorales. En effet, elles sont qualifiées d'acineux si elles forment un petit sac, papillaires en forme de doigt de gant et micro-papillaires pour des saillies très petites, ou de solides ou mixtes pour, respectivement, des structures épaisses ou la combinaison de plusieurs aspects. Lorsque la morphologie de la tumeur ne permet pas d'établir la classification précise des adénocarcinomes, l'expression de cytokératine 7 associée à l'absence de la cytokératine 20 est recherchée.

3.2.3. Carcinomes à grandes cellules

Les carcinomes à grandes cellules représentent 10 % des cancers bronchiques dont 90% sont associés au tabagisme. Ces carcinomes indifférenciés très agressifs, reposent sur un diagnostic d'exclusion puisqu'ils ne s'apparentent à aucune des morphologies d'un carcinome neuroendocrinien, d'un épidermoïde ou encore d'un adénocarcinome. Avec un nucléole très développé et un cytoplasme dense, ces carcinomes se caractérisent par des cellules « de grandes tailles » dont le rapport noyau/cytoplasme est élevé. Le potentiel métastatique élevé des carcinomes à grandes cellules est souvent lié à un diagnostic tardif qui ne peut être réalisé qu'à partir de pièces de résection chirurgicale.

3.3. Classification TNM

En complément des examens histologiques, le bilan tumoral des CBNPC résulte aussi des stades d'évolution de la tumeur pour conditionner le traitement adapté. En effet, la classification TNM est un système de classement des cancers, développé entre 1943 et 1952 par le chirurgien français Pierre Denoix, afin d'évaluer l'extension tumorale. Chacune des trois lettres de la classification caractérise l'évolution locale (T), ganglionnaire (N) et à distance (M) de la tumeur. Un coefficient est également associé à chaque lettre en fonction de l'étendue du caractère évalué (**Tableau 3**). La lettre T, pour *Tumor*, dépend de la taille et la localisation de la tumeur initiale dont la côte attribuée reflète le volume et l'étendue tumorale progressivement plus importante de T0 à T4. La lettre N pour *Node* caractérise, quant à elle, l'extension tumorale au niveau ganglionnaire déclinée de N0 à N3 en fonction de la taille et de la localisation des adénopathies. Pour finir, la lettre M pour *Metastasis*, fait référence à l'absence (M0) ou la présence (M1) de métastases à distance de l'organe primitif (Sculier, Berghmans, and Meert 2014).

8 ^{ÈME} ÉDITION DE LA CLASSIFICATION TNM DES CBNPC (2017)		
T (Tumor, tumeur primitive)		
Tx	Tumeur non évaluée	
T0	Pas de tumeur	
Tis	Carcinome <i>in situ</i>	
T1	Tumeur ≤ 3 cm, entourée par le poumon ou la plèvre viscérale, sans invasion de la bronche lobaire	
	T1a	Tumeur ≤ 1 cm dans sa plus grande dimension
	T1b	Tumeur > 1 cm mais ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension
	T1c	Tumeur > 2 cm mais ≤ 3 cm dans sa plus grande dimension
T2	Tumeur > 3 cm mais ≤ 5 cm, présentant une invasion de bronche lobaire (sans atteinte de la carène) invasion de la plèvre viscérale ou une atélectasie ⁴ ou une pneumopathie obstructive pulmonaire	
	T2a	Tumeur > 3 cm mais ≤ 4 cm dans sa plus grande dimension
	T2b	Tumeur > 4 cm mais ≤ 5 cm dans sa plus grande dimension
T3	Tumeur > 5 cm mais ≤ 7 cm, présentant un ou plusieurs nodules tumoraux distincts dans un même lobe et/ou une invasion soit de la paroi thoracique comprenant la plèvre pariétale et les tumeurs de l'apex, soit le nerf phrénique ou encore du péricarde	
T4	Tumeur > 7 cm, présentant un ou plusieurs nodules tumoraux distincts dans un lobe homolatéral (différent de celui de la tumeur initiale) ou une invasion d'une des structures suivantes : diaphragme, médiastin, cœur, gros vaisseaux, trachée, nerf récurrent, œsophage, corps vertébral, carène.	
N (Node, envahissement ganglionnaire)		
Nx	Envahissement des ganglions lymphatiques non évalué	
N0	Absence d'envahissement ganglionnaire	
N1	Métastase aux ganglions péri-bronchiques et/ou hilaires homolatéraux	
N2	Métastase aux ganglions médiastinaux homolatéraux et/ou ganglions sous carénaires	
N3	Métastase aux ganglions médiastinaux controlatéraux et/ou ganglions sous-claviculaires, homo et controlatéraux	
M (Metastasis, métastases à distance)		
Mx	Métastases à distance non évaluées	
M0	Absence de métastases à distance	
M1	Présence de métastase(s) à distance	
	M1a	Nodule(s) tumoral(aux) distinct(s) dans un lobe controlatéral ou tumeur avec nodules pleuraux (ou péricardiques) ou épanchement pleural (ou péricardique) malin
	M1b	Métastase extra-thoracique unique
	M1c	Métastases extra-thoraciques multiples dans un ou plusieurs organes

Tableau 3 : Classification TNM des CBNPC (8^{ème} édition, 2017)

(Detterbeck 2018, ESMO 2017)

⁴ **Atélectasie** : pathologie caractérisée par l'affaissement des alvéoles de la totalité ou d'une partie d'un des deux poumons, associé à l'absence de ventilation (inspiration par minute)

Le moyen d'identification de la classification est aussi annoté par le préfixe « c » pour un examen clinique ou « p » pour un examen anatomopathologique. Les CBPNC peuvent être localisés (stade I et II), localement avancés (stade III) ou disséminés (stade IV) (CEP. 2017) (**Tableaux 4 & 5**). L'évaluation de l'extension générale du cancer par stade de localisation de la tumeur est indispensable à la prise de décision d'un traitement thérapeutique (chirurgie, chimiothérapie ou encore radiothérapie).

4 STADES ASSOCIÉS A LA SURVIE A 5 ANS DES PATIENTS CBNPC (2017)						
Type	Stade	T	N	M	Survie à 5 ans cTNM	Survie à 5 ans pTNM
LOCALISÉ	IA1	T1a	N0	M0	92%	90%
	IA2	T1b	N0	M0	83%	85%
	IA3	T1c	N0	M0	77%	80%
	IB	T2a	N0	M0	68%	73%
	IIA	T2b	N0	M0	60%	65%
	IIB	T1a-c	N1	M0	53%	56%
	T2a-b	N1	M0			
	T3	N0	M0			
LOCALEMENT AVANCÉ	IIIA	T1a-c	N2	M0	36%	41%
		T2a-b	N2	M0		
		T3	N1	M0		
		T4	N0-N1	M0		
	IIIB	T1a-c	N3	M0	26%	24%
		T2a-b	N3	M0		
	T3-T4	N2	M0			
IIIC	T3-T4	N3	M0	13%	12%	
DISSEMINÉ	IVA	Tout T	Tout N	M1a-b	10%	-
	IVB	Tout T	Tout N	M1c	0%	-

Tableau 4 : Les différents stades des CBNPC selon la classification TNM

(ESMO 2017)

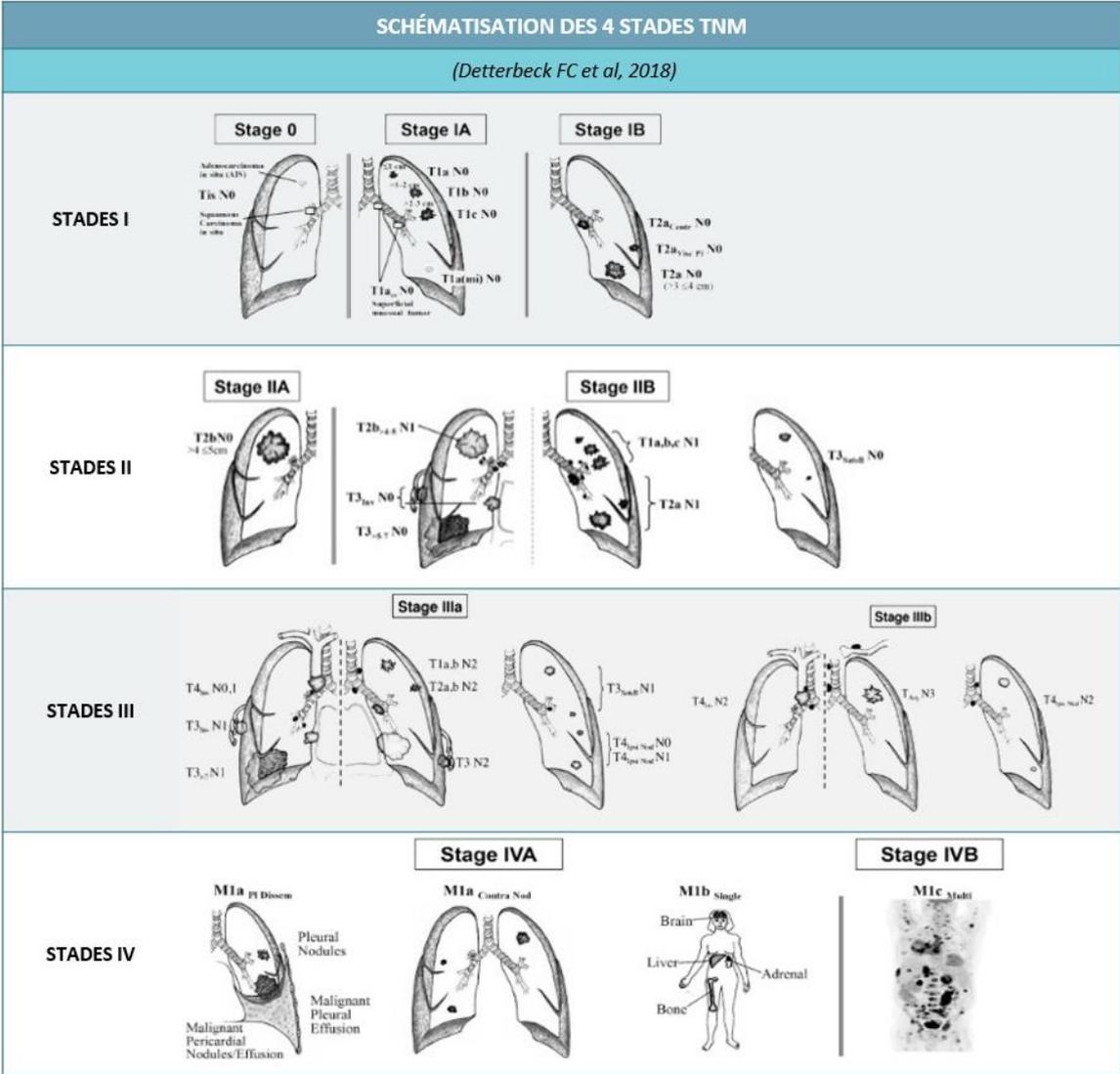


Tableau 5 : Illustration des différents stades de la classification TNM

(Detterbeck 2018)

4. Stratégies thérapeutiques et traitements

La prise en charge thérapeutique des patients atteints de cancers broncho-pulmonaires est basée sur le type histologique (CBPC ou CBNPC) et le stade d'évolution (TNM) de la tumeur. Actuellement, il existe trois thérapies qui diffèrent au niveau de leur mode d'action, et qui peuvent être utilisées seules, associées ou de façon séquentielles. La stratégie de traitement adoptée est fonction du résultat diagnostic établi (Miller *et al.* 2016) (**Figure 3**).

4.1. Thérapies conventionnelles

Les thérapies conventionnelles font usuellement référence aux techniques de chirurgie, de chimiothérapie et de radiothérapie, possibles et adaptées les unes par rapport aux autres en fonction du bilan d'extension tumorale.

L'objectif principal de la **chirurgie** est d'aboutir à une exérèse complète de la tumeur et constitue le moyen thérapeutique le plus efficace pour les cancers localisés. D'un point de vue technique, la résection chirurgicale permet l'ablation d'un ou plusieurs lobes pulmonaires atteints (lobectomie, bi-lobectomie) ou même de la totalité du poumon (pneumectomie). La résection segmentaire, qui consiste à l'ablation d'une partie d'un lobe, est en revanche rarement pratiquée car trop souvent associée à un fort taux de récurrence locale pour une technique chirurgicale lourde (Wagner 2008). De façon complémentaire, les chirurgiens procèdent également à un curage ganglionnaire à l'origine de l'ablation des ganglions lymphatiques situés aux alentours de la tumeur pour une analyse approfondie de l'état de dissémination métastatique potentielle. A l'issue de cet examen, les médecins statuent sur la nécessité d'un traitement additionnel post-chirurgical, limitant la récurrence du cancer à partir du même ou d'un autre organe (Manser *et al.* 2005).

La radiothérapie et la chimiothérapie sont des traitements qui peuvent être complémentaires, en amont ou en aval, ou suppléants à la chirurgie pour des patients ne pouvant pas y avoir recours (fonction respiratoire insuffisante et/ou extension tumorale trop avancée). La **radiothérapie** est un traitement locorégional qui consiste à exposer la tumeur à des rayons de haute énergie capables de détruire les cellules cancéreuses. L'irradiation est courte, légère et pratiquée quotidiennement pendant 2 à 8 semaines. La **chimiothérapie**, quant à elle, n'agit pas seulement localement mais peut aussi traiter des tumeurs invisibles sur les examens médicaux. Cette approche consiste à prescrire des molécules délétères pour

les cellules cancéreuses comme les sels de platine (cisplatine ou carboplatine) ou encore les taxanes (docétaxel, paclitaxel). L'administration médicamenteuse s'effectue de façon hebdomadaire ou toutes les 3 à 4 semaines pendant 3 à 4 mois minimum. Ces thérapies individuelles ou combinées, indolores de prime abord, sont associées à de nombreux effets secondaires, passant d'une fatigue intense à des nausées/vomissements, qui peuvent être limités par des traitements médicamenteux ou des soins de support.

4.2. Thérapies ciblées et biomarqueurs pronostics

De nos jours, l'avancée des moyens technologiques a permis de développer des thérapies ciblées, capables de compléter ou même de remplacer les thérapies conventionnellement utilisées. Les thérapies ciblées sont basées sur le développement de molécules qui vont cibler spécifiquement les **mutations génétiques** à l'origine de la progression tumorale. Cette approche thérapeutique repose sur l'analyse de biomarqueurs pronostics caractéristiques pour chaque cancer lors du diagnostic et l'administration d'un traitement ciblant les voies de signalisation impliquées dans la croissance et la survie des cellules cancéreuses. Actuellement, de nombreux agents intervenant sur diverses mutations de gènes sont déjà sur le marché ou encore en cours d'évaluation clinique (Kanwal, Ding, and Cao 2017, Puztaszeri *et al.* 2011) (**Figure 5**).

Parmi eux, les mutations des oncogènes *RAS* (*H-RAS*, *K-RAS* et *N-RAS*) sont les plus fréquemment retrouvées notamment avec 25 à 30% de mutation activatrice du gène *K-RAS* (*homologous to Kirsten murine sarcoma virus oncogene*) dans les adénocarcinomes pulmonaires. Le **gène *K-RAS*** code pour une GTP-ase impliquée dans la transduction de signal du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire, en aval des récepteurs aux facteurs de croissance, notamment l'EGFR. En cas de mutation, la protéine Ras est phosphorylée de façon permanente et induit une activation constitutive de signaux impliqués dans la croissance cellulaire, la prolifération et la survie. A ce jour, aucune thérapie ciblée n'est disponible pour *K-RAS* et cette mutation est de mauvais pronostic. En effet, son implication en aval dans la voie de signalisation de l'EGFR est associée à une résistance des traitements anti-EGFR chez les patients mutés pour le gène *K-RAS* (Pan *et al.* 2016).

L'EGFR est un récepteur transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs tyrosine kinase ERBB comprenant quatre membres de HER1 à HER4. Les **mutations de l'EGFR**

interviennent dans 10% des CBNPC avec une majorité dans les adénocarcinomes (Smouse *et al.* 2009). L'activation dimérique (homo/hétérodimère) des récepteurs de l'EGF stimule la transduction de signaux prolifératifs, apoptotiques, angiogéniques, invasifs et métastatiques. Bien souvent, les altérations de l'EGFR s'illustrent par des mutations au niveau des exons 18 à 21 dont 90% correspondent à des délétions dans l'exon 19. Celles-ci vont notamment altérer les voies de sauvegarde et de maintien du génome par l'intermédiaire de la protéine p53 mais vont aussi avoir des effets anti-apoptotiques médiés par l'activation de la kinase Akt. Des inhibiteurs de tyrosine kinase ont pu être développés en tant que thérapie anti-EGFR dans les CBNPC tels que le Gefitinib (Iressa[®], AstraZeneca), l'Erlobitinib (Tarceva[®], Roche) ou encore l'Afatinib (Gilotrif[®], Boehringer-Ingelheim) (Troiani *et al.* 2016).

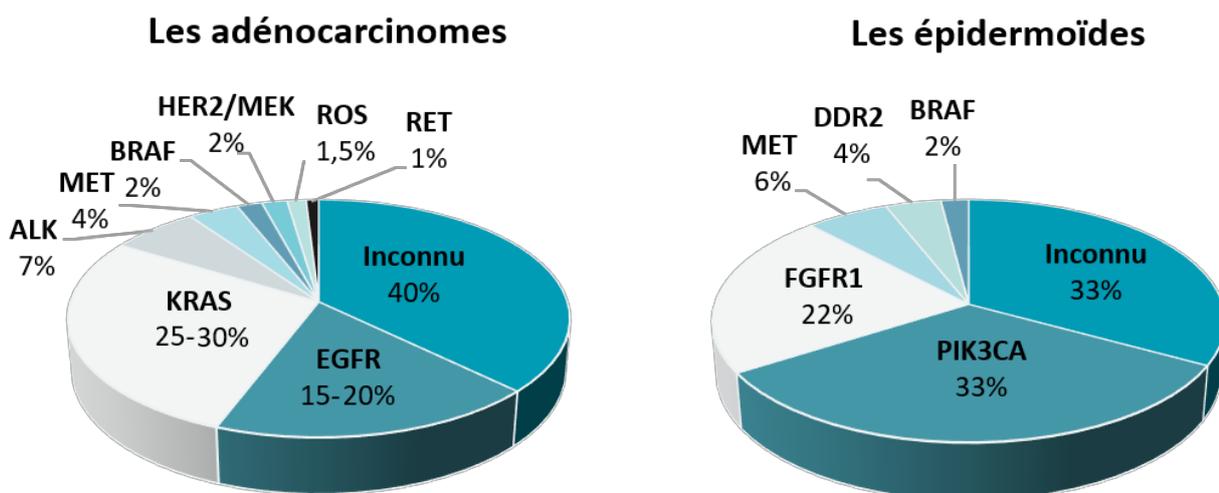


Figure 5 : Classification moléculaire des CBNPC

Modifié d'après (Boolell *et al.* 2015)

Grâce à ces traitements les patients CBNPC présentant une altération de l'EGFR sont associés à un meilleur pronostic, s'ils ne présentent pas pour autant de mutation K-RAS.

Une autre molécule cible reconnue dans les cancers pulmonaires est le **gène de fusion ALK-EML4** codant pour la protéine de fusion de l'*anaplastic lymphoma kinase* associée à l'*echinoderm microtubule-associated protein-like 4*. Chez les patients CBNPC, un réarrangement des gènes *ALK* et *EML4* est mis en évidence dans 3 à 7% des cas (Soda *et al.* 2007). A l'état physiologique, le gène *ALK* code pour un récepteur à activité tyrosine kinase de la famille des récepteurs à insuline. Cependant, à l'état pathologique, le gène *ALK* peut subir une translocation en 2p23 avec le gène *ELK4* à l'origine de différents variants oncogéniques impliqués dans la prolifération, la migration et la survie des cellules tumorales. Parmi ces réarrangements, les variants CBNPC les plus connus sont le E13:A20 avec 33% des cas, correspondant à une fusion entre l'exon 13 du gène *EML4* et l'exon 20 du gène *ALK*, et le E6a/b:A20 avec 29% des cas, correspondant au variant 3a/b (Sasaki *et al.* 2010). L'un des premiers traitements ciblés mis en place pour ce gène est le Crizotinib (Xalkori®, Pfizer), un inhibiteur ALK/MET (Pillai and Ramalingam 2012). L'efficacité de cet inhibiteur a été reconsidérée suite au développement d'une résistance chez les patients traités (Capelletti, Gelsomino, and Tiseo 2014, Duchemann, Friboulet, and Besse 2015). De ce fait, des inhibiteurs ALK spécifiques ont été développés par la suite, incluant le Ceritinib (Zykadia®, Novartis) et l'Alectinib (Alecensa®, Genentech/Roche). Actuellement, des recherches prometteuses sont en cours d'essais cliniques (phases II et III) pour développer de nouveaux inhibiteurs ALK, tout en tenant compte des patients résistants au Crizotinib, tels que le Lorlatinib, l'Entrectinib et le Brigatinib (Della Corte *et al.* 2018).

De nombreux autres traitements associés à divers biomarqueurs moléculaires pronostics des cancers broncho-pulmonaires existent et continuent d'émerger. Parmi eux, le Dabrafenib associé au Trametinib, en tant qu'inhibiteurs de la sérine thréonine kinase B-RAF (Paik *et al.* 2015) ou encore le Cabozantinib, un inhibiteur de tyrosine kinase de l'HGFR ou de c-MET (Planchard *et al.* 2016) peuvent-être cités.

De plus, durant la dernière décennie, le rôle des **microARN (miARN)** dans la régulation des oncogènes impliqués dans le cancer du poumon a été mis en évidence. Les miARN forment une séquence simple brin d'environ 18 à 24 nucléotides capables de réprimer l'expression protéique par la dégradation de leur ARNm. En effet, Johnson *et al.* ont montré une diminution

d'expression des let-7, une famille de miARN, dans les cancers broncho-pulmonaires, associée à un fort taux d'expression des protéines RAS (Johnson *et al.* 2005). De même, le miARN-128b, à l'origine de l'inhibition de l'expression de l'EGFR, se retrouve inhibé en condition pathologique (Weiss *et al.* 2008). De plus, l'expression de l'oncogène p53 régulant l'apoptose cellulaire est associée aux miARN-34a, miARN-34b et au miARN-34c (He *et al.* 2007).

4.3. Immunothérapies

L'immunothérapie est une technique thérapeutique qui se développe depuis ces 5 dernières années. Suite à son autorisation de mise sur le marché (AMM) en 2015, les premiers résultats offrent des perspectives prometteuses. Contrairement aux thérapies conventionnelles et ciblées qui visent les cellules tumorales, l'immunothérapie va quant-à-elle « booster » le système immunitaire pour l'aider à détecter et éliminer les cellules cancéreuses. L'utilisation **d'anticorps bispécifiques** facilite l'élimination des cellules tumorales en favorisant un rapprochement entre les cellules cancéreuses et les lymphocytes T, à partir d'anticorps capables de se lier aux deux types cellulaires comme, par exemple, le Blinatumomab (Blinicyto®).

Selon l'INCa, les thérapies cellulaires adoptives et les vaccinations thérapeutiques obtiennent des résultats prometteurs dans le cadre d'essais cliniques. En effet, **les transferts adoptifs de cellules** consistent à sélectionner et/ou créer des cellules immunitaires afin de les modifier et/ou les « booster » en laboratoire pour les réinjecter, à terme, dans l'organisme du patient. Par exemple, l'approche CAR-T est basée sur le prélèvement de lymphocytes T du patient, modifiés génétiquement par la suite pour exprimer des récepteurs antigéniques chimériques de surface (CAR) capables de reconnaître les antigènes tumoraux du patient. Ainsi, la prolifération et le transfert adoptif de ces lymphocytes T génétiquement modifiés chez le patient permettent une meilleure reconnaissance spécifique des cellules cancéreuses à détruire. Par ailleurs, la **vaccination thérapeutique** vise à stimuler et « éduquer » le système immunitaire d'un patient contre des antigènes tumoraux spécifiques. Pour cela, des analyses génétiques spécifiques réalisées sur la tumeur de chaque patient permet d'élaborer des vaccins personnalisés à base de protéines et/ou néo-antigènes tumoraux et de les injecter chez le patient pour stimuler la réponse immunitaire spécifique.

L'une des voies d'immunothérapie les plus connues concerne **les inhibiteurs de « points de contrôle immunitaire »** tels que PD-1, PD-L1 et CTLA-4. Le récepteur PD-1 (*Programmed Death-1*) est présent à la surface des cellules immunitaires T et se lie spécifiquement aux ligands PD-L1 et PD-L2. Exprimé physiologiquement par les cellules présentatrices d'antigène et pathologiquement par certaines cellules tumorales, PD-L1 est un ligand qui, en se liant à PD-1, inhibe la réponse immune T. Le Nivolumab (Opdivo®) et le Pembrolizumab (Keytruda®) sont des anticorps monoclonaux dirigés contre PD-1 tandis que le MEDI4736 est un anticorps monoclonal spécifique de PD-L1. Ce traitement est aussi efficace sur d'autres cancers comme le mélanome par exemple (Antonia *et al.* 2016, Sacher and Gandhi 2016). Une stratégie est également utilisée pour augmenter la réactivité immunitaire des cellules T vis à vis des cellules tumorales. En effet, la protéine CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) est surexprimée à la surface des cellules T chez les patients CBNPC. Son rôle est d'agir comme un « point de contrôle » pour réguler la réponse immune T par inhibition des cellules T. De ce fait, un anticorps monoclonal de CTLA-4 permettant de lever l'inhibition de la réponse immunitaire T a été développé, il s'agit de l'Ipilimumab (Yervoy®). Une récente étude a d'ailleurs révélé l'importance du stade d'évolution de la tumeur pour l'efficacité de ce traitement. En effet, le pronostic serait meilleur en cas de dissémination ganglionnaire (Paulsen *et al.* 2017). La combinaison de ce traitement avec les thérapies PD-1/PD-L1 a obtenu des résultats encourageants, cependant, elle est également à l'origine d'effets secondaires sévères chez certains patients (Antonia *et al.* 2016). De récents essais cliniques ont obtenus des résultats prometteurs concernant la combinaison d'immunothérapie PD-1 et CTLA-4 avec d'autres agents ciblant des biomarqueurs pronostics tels que l'EGFR (Marmarelis and Aggarwal 2018). L'association des thérapies entre elles tend à obtenir des traitements de meilleur pronostic, pouvant améliorer les conditions de survie du patient.

4.4. Thérapies adaptées selon le type histologique

L'approche thérapeutique des CBPC, cancers particulièrement invasifs, est adaptée selon deux formes reconnues par les spécialistes. En effet, la forme localisée au thorax est généralement associée aux radio- chimiothérapies tandis que la forme disséminée se limite à la chimiothérapie, excluant toute chirurgie. Cependant, une étude récente a montré que les patients atteints de CBPC à stade précoce ayant eu recours à une résection chirurgicale, ont

une survie significativement plus longue que les patients traités par radio-chimiothérapies (Wakeam *et al.* 2017). De même, des essais cliniques sur le Nivolumab seul ou associé à l'Ipilimumab ont permis d'envisager un recours prometteur à l'immunothérapie pour les CBPC (Antonia *et al.* 2016).

Concernant les CBNPC, la chirurgie reste la thérapie de référence pour un stade précoce localisé (stades I et II) sans contre-indication chirurgicale du patient. Dans certains cas, une radio- et/ou chimio- thérapie post-opératoire est conseillée pour renforcer les résultats de la chirurgie et en cas de contre-indication, c'est la radiothérapie qui est souvent préconisée. En revanche, lorsque le stade de la tumeur est jugé trop avancé et disséminé (stades III et IV), les traitements non-invasifs pour le patient sont recommandés. En effet, la succession ou la combinaison des traitements radio-chimiothérapeutiques, immuno-thérapeutiques et les thérapies ciblées vise à limiter au maximum la survie et la croissance de la tumeur et/ou des métastases dans l'organisme. Selon l'état de santé général du patient, ces thérapies sont adaptées (posologie/dose, fréquence, seules ou en combinaison) et ont plutôt pour objectif d'augmenter la survie du patient avec la maladie que de l'éradiquer (Molina, Adjei, and Jett 2006, Raez, Fein, and Podack 2005, Senan and Lagerwaard 2005, Wagner 2008).

PARTIE II

Progression tumorale et transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

II. Progression tumorale et la TEM

1. Progression tumorale

1.1. Généralités sur la tumorigenèse

La **tumorigenèse** est un processus qui repose sur la formation d'une tumeur au sein de l'organisme. La terminologie du mot tumeur, du latin *tumere* qui signifie « enfler », fait référence à la formation d'une masse tissulaire à l'origine d'une prolifération cellulaire excessive liée à des anomalies, bien souvent génétiques, infligées aux cellules de l'organisme. Les tumeurs non cancéreuses qualifiées de bénignes sont caractérisées par une forme régulière incapable de se propager de façon anarchique, contrairement aux tumeurs cancéreuses qualifiées de malignes qui forment une masse capable d'envahir les tissus environnants.

La classification des cancers est basée sur la classification internationale des maladies pour l'oncologie de 2013 (WHO 2013) et repose sur deux systèmes de classification différents. Le système topographique, établi selon le site primaire d'origine de la tumeur, classe le cancer en fonction de la partie anatomique du développement initial comme le cancer du poumon, le cancer du sein ou encore le cancer de la prostate. Le système morphologique, établi selon le type tissulaire, décline six grandes catégories de cancers classées en fonction de l'origine histologique de la cellule tumorale initiale :

- Les **carcinomes** proviennent de l'épithélium et représentent 80 à 90 % des cancers réunissant les adénocarcinomes et les cancers épidermoïdes (section Intro - I.3).
- Les **sarcomes** émergent du tissu conjonctif comme les os, la graisse ou les muscles, réunissant respectivement les ostéosarcomes, les liposarcomes et les myosarcomes.
- Les **leucémies**, plus connues sous le nom de « cancers du sang », affectent les cellules de la moelle osseuse, site de production des cellules sanguines.
- Les **myélomes** se développent à partir des plasmocytes, cellules de la moelle osseuse, productrices d'anticorps.
- Les **lymphomes** sont issus des lymphocytes, cellules du système lymphatique (ganglions, rate et foie) et réunissent les lymphomes hodgkinien et non hodgkinien.
- Les **cancers mixtes** regroupent au moins deux catégories de cancer mélangées.

Une autre classification différencie seulement les cancers « solides » qui forment une masse individualisée (carcinomes et sarcomes), et les cancers « liquides » qui atteignent les cellules sanguines (leucémies et lymphomes). Bien que les cellules sanguines ne soient pas atteintes initialement par certains cancers, la capacité invasive de certaines tumeurs permet la dissémination des cellules cancéreuses par la circulation sanguine, étape clé de la progression tumorale.

1.2. Étapes de la progression tumorale

La progression tumorale est un processus de plusieurs étapes qui illustre les phases de développement d'une tumeur, de son initiation à sa dissémination métastatique dans un tissu sous-jacent.

1.2.1. Processus de transformation cellulaire

La formation des cancers d'origine épithéliale et leur dissémination métastatique impliquent une cascade complexe d'évènements, engendrés par des mécanismes cellulaires et moléculaires multiples. Les cellules épithéliales « normales » subissent continuellement des altérations génétiques et/ou épigénétiques initiées par des agents cancérigènes environnementaux, chimiques ou biologiques ou des facteurs génétiques héréditaires (ARC & INCa 2013). Dans la majorité des cas, les altérations parviennent à être corrigées par les systèmes de maintenance de l'intégrité du génome ou, à défaut, les cellules affectées sont directement éliminées par des mécanismes de mort cellulaire programmée (apoptose). Ainsi, les systèmes correcteurs associés au « suicide cellulaire » permettent de maintenir les cellules de l'organisme saines. Malheureusement, lorsque les systèmes de corrections échouent, la cellule altérée peut proliférer et ainsi arborer des propriétés pro-oncogènes. En effet, les 6 premières caractéristiques du cancer illustrées par l'acquisition de capacités biologiques particulières cellulaires et moléculaires ont été décrites par D. Hanahan et R. Weinberg au cours de l'année 2000 (Hanahan and Weinberg 2000). Près d'une décennie plus tard, 4 autres caractéristiques fondamentales tumorales s'ajoutent et complètent leur étude. De ce fait, les capacités tumorales d'une cellule sont définies selon les 10 grandes propriétés fondamentales suivantes : le **maintien des signaux prolifératifs** conduisant à une prolifération excessive, **l'échappement aux suppresseurs de croissance** et le **potentiel de réplication illimitée**

maintenant les capacités multiplicatives cellulaires, l'**instabilité génomique** favorisant des mutations pro-oncogènes, la **dérégulation du métabolisme cellulaire** augmentant la production énergétique, la **résistance à l'apoptose** empêchant la mort cellulaire programmée, l'**échappement à la destruction immunitaire** et l'**inflammation pro-tumorale** associant les cellules inflammatoires à la tumeur, ou encore l'**activation de processus invasifs** et métastatiques permettant également l'**induction de l'angiogenèse** (Hanahan and Weinberg 2011). Une étude plus récente a également souligné l'**importance du détournement de la vascularisation préexistante** au profit de la tumeur et l'**augmentation de la survie cellulaire globale** en réponse au stress altéré (Fouad and Aanei 2017) (**Figure 6**).

1.2.2. Tumorigenèse : notion de *carcinome in situ*

La transformation conduit à la multiplication des cellules normales en cellules tumorales en leur donnant un **avantage sélectif**. En effet, une prolifération cellulaire excessive d'une seule cellule tumorale engendre **une expansion clonale sélective** responsable d'une dysplasie, à l'origine de la formation d'une tumeur primitive. Cette tumeur primaire, qualifiée de **carcinome *in situ* ou « non invasif »**, reste confinée au sein de la couche épithéliale sans rupture de la membrane basale. Ces cellules tumorales primaires, présentant une forte instabilité génétique, poursuivent l'accumulation de nombreuses anomalies à l'origine d'une **hétérogénéité tumorale**. En effet, si certaines cellules continuent de croître au sein même de leur massif tumoral primitif, d'autres présentent des propriétés invasives menant au franchissement de la lame basale.

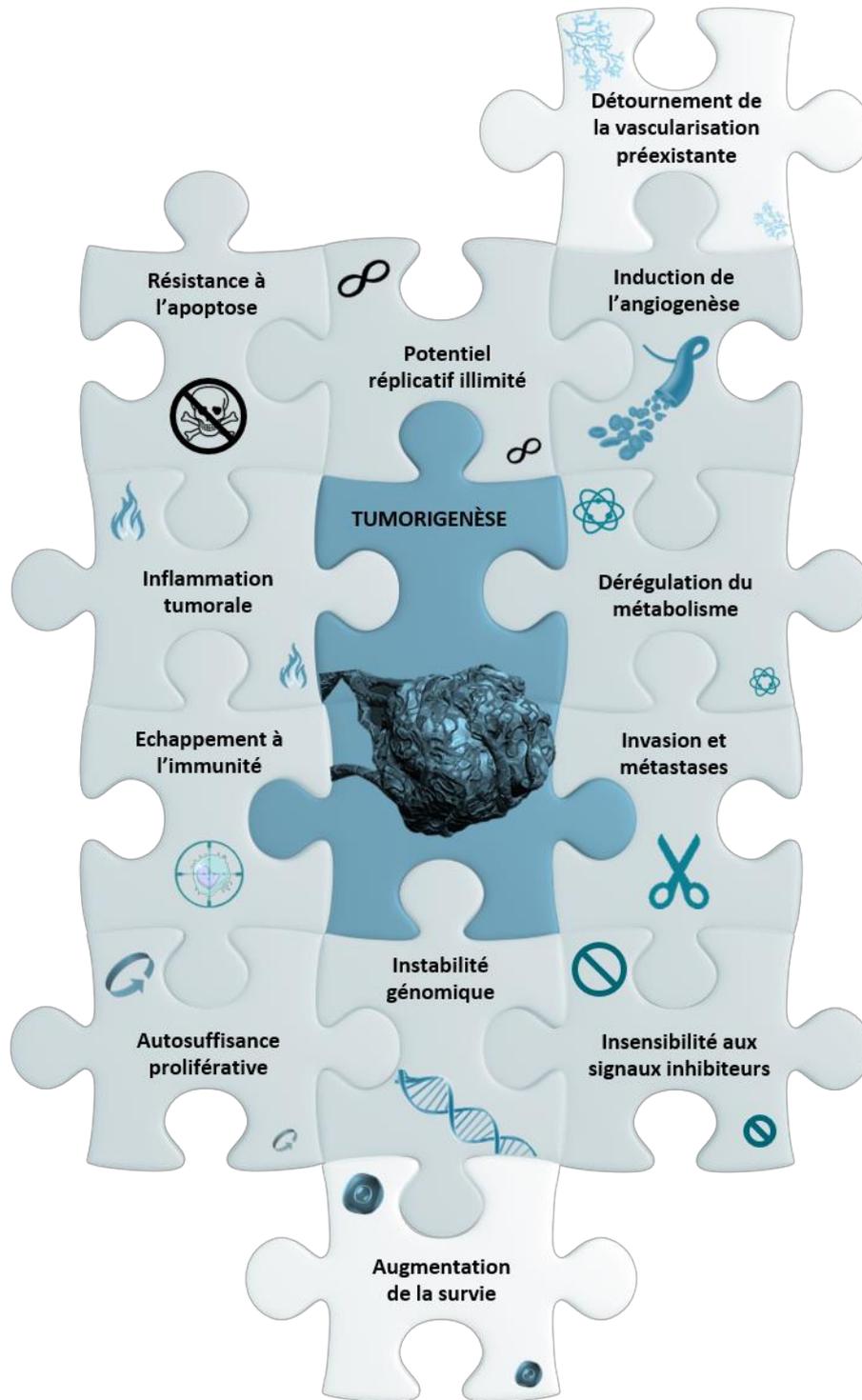


Figure 6 : Propriétés fondamentales des cellules tumorales

D'après (Hanahan and Weinberg 2011)

1.2.3. Invasion tumorale et métastases

L'**invasion tumorale** est caractérisée par la pénétration d'une cellule tumorale dans un tissu avoisinant résultant de son passage à travers la membrane basale. L'invasion locale au niveau d'un épithélium est qualifiée de **carcinome invasif** et constitue la première étape du développement d'une tumeur secondaire dans un nouvel organe ou de métastases (**Figure 7**).

En effet, le **détachement cellulaire**, associé à la perte d'expression de molécules d'adhérence, est aussitôt suivi de l'altération du tissu conjonctif sous-jacent incluant l'intervention de protéases capables de **dégrader la matrice extracellulaire**. Parallèlement, les cellules cancéreuses expriment différents facteurs angiogéniques qui influencent la formation de **néo-vaisseaux tumoraux**, facilitant l'infiltration cellulaire indispensable à la progression tumorale. L'étape suivante est celle de l'**intravasation**, définie par le passage des cellules tumorales dans les vaisseaux sanguins et/ou lymphatiques. Ces **cellules tumorales circulantes (CTCs)**, soumises à de nombreuses contraintes mécaniques (pression sanguine, friction des capillaires), ne sont plus capables de proliférer et tendent à s'agglutiner sous forme d'agrégats pour optimiser leur résistance. De plus, les CTCs sont capables d'interagir avec les cellules sanguines et notamment plaquettaires pour se protéger des chocs mécaniques sanguins. Bien que de nombreuses CTCs soient éliminées par les cellules immunitaires présentes dans le sang, certaines parviennent à ressortir des vaisseaux par un mécanisme d'**extravasation**.

A ce moment, les cellules tumorales entrent en **contact avec les cellules endothéliales** qui tapissent les vaisseaux, puis s'infiltrent dans le tissu sous-jacent. Certaines cellules tumorales, n'étant pas adaptées à ce nouvel environnement, vont alors entrer en mort cellulaire programmée ou rester en dormance. Pour d'autres, la colonisation d'un tissu secondaire facilite à nouveau leurs capacités de prolifération et de survie donnant naissance à des **métastases** (Arvelo, Sojo, and Cotte 2016, CoPath 2012) (**Figure 7**).

La dissémination métastatique, étape finale de la progression tumorale, nécessite différentes modifications phénotypiques cellulaires et moléculaires permettant à la cellule tumorale d'acquérir des propriétés migratoires et invasives importantes.

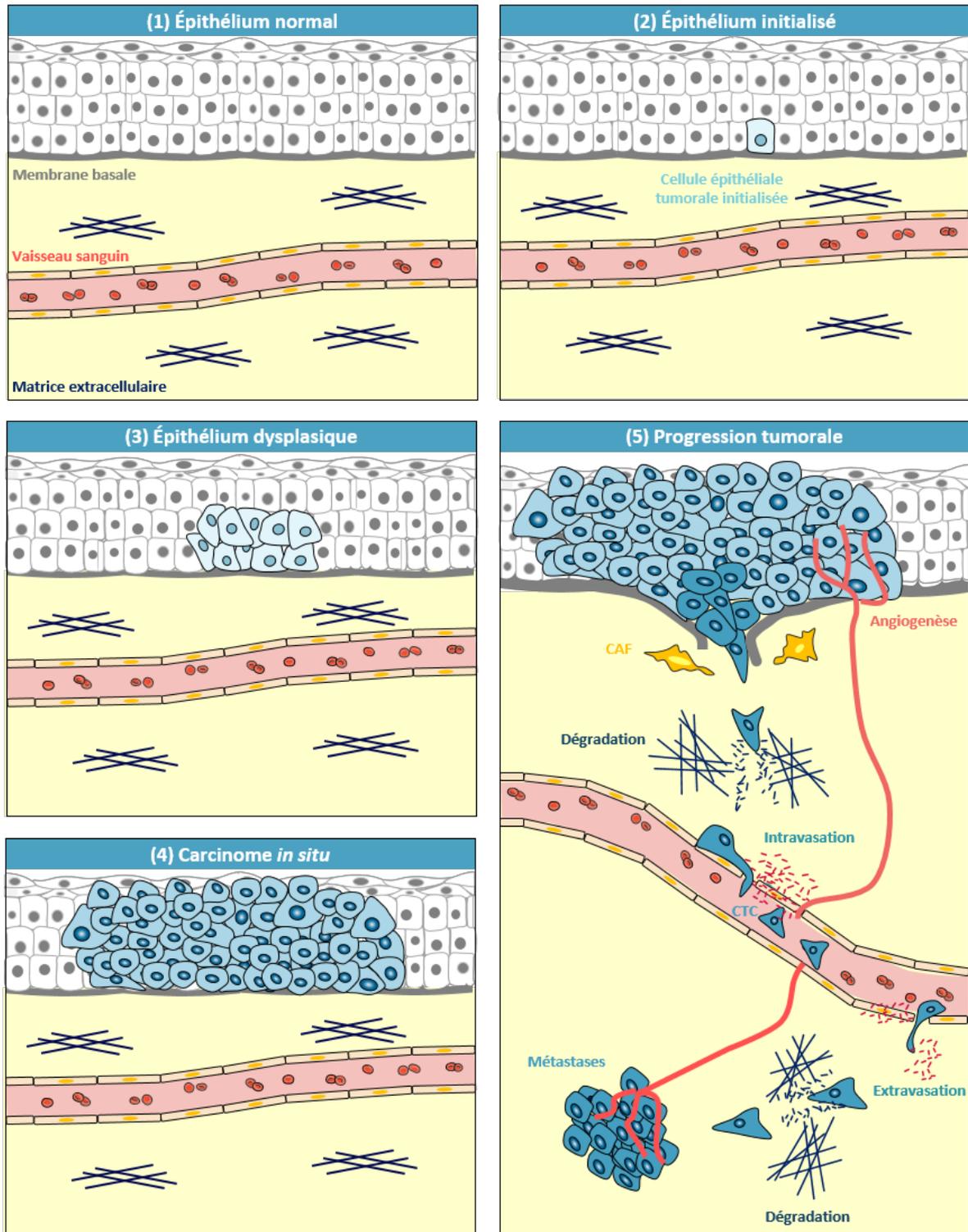


Figure 7 : Les étapes de la progression tumorale

2. Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) se définit par un processus cellulaire et moléculaire permettant la conversion d'une cellule épithéliale en une cellule ayant des caractéristiques mésenchymateuses.

2.1. Différents types de TEM

La notion de plasticité cellulaire repose largement sur les phénomènes de transition épithélio-mésenchymateuse. En effet, la TEM est définie par la conversion d'une cellule de phénotype épithélial, cohésive et polarisée, en une cellule de phénotype mésenchymateux, individualisée et invasive. Cette transition nécessite de nombreuses modifications cellulaires et moléculaires qui peuvent moduler le caractère phénotypique d'une cellule aussi bien au niveau morphologique que fonctionnel. Bien que la TEM ait été découverte pour la première fois au cours de l'embryogenèse normale, elle est également impliquée dans d'autres processus physiologiques et pathologiques comme la cicatrisation et la néoplasie des tumeurs (Hay 2005, Kalluri and Weinberg 2009, Zeisberg and Neilson 2009) (**Figure 8**).

La **TEM de type 1**, découverte par la biologiste américaine Elizabeth Hay en 1968, se déroule au cours du développement embryonnaire physiologique. Lors de la gastrulation, les cellules épithéliales de la ligne primitive, à l'origine du mésendoderme, vont subir une TEM permettant la formation du mésoderme et de l'endoderme (Nakaya and Sheng 2008). La TEM est également impliquée dans la neurulation, par la migration des cellules de la crête neurale, et dans la formation des valves cardiaques (Pallet and Anglicheau 2008). D'un point de vue moléculaire, la TEM au cours de l'embryogenèse implique de nombreuses voies de signalisation telle que Wnt, FGF ou encore BMP (Acloque *et al.* 2009). L'organogenèse se poursuit ensuite grâce à la réversibilité du phénomène de TEM, appelé TME pour transition mésenchymo-épithéliale, qui permet la formation d'un épithélium secondaire à partir du mésenchyme primaire.

La **TEM de type 2** intervient dans les processus de régénération tissulaire comme la cicatrisation et la fibrose (Kim, *et al.* 2006, Savagner and Arnoux 2009). En effet, la réaction inflammatoire générée par l'ensemble de ces phénomènes physiologiques initie des signaux pro-inflammatoires à l'origine de ce type de TEM. Dans ce cas, les cellules qui adoptent un

phénotype mésenchymateux migrent jusqu'à la zone lésée, créent un tissu cicatriciel et se redifférencient en cellules tissulaires d'origine, permettant la cicatrisation et la régénération des tissus lésés. Dans le cas pathologique de la fibrose, les cellules sont maintenues dans un état de TEM irréversible par une inflammation chronique, qui conduit parfois à la destruction de l'organe.

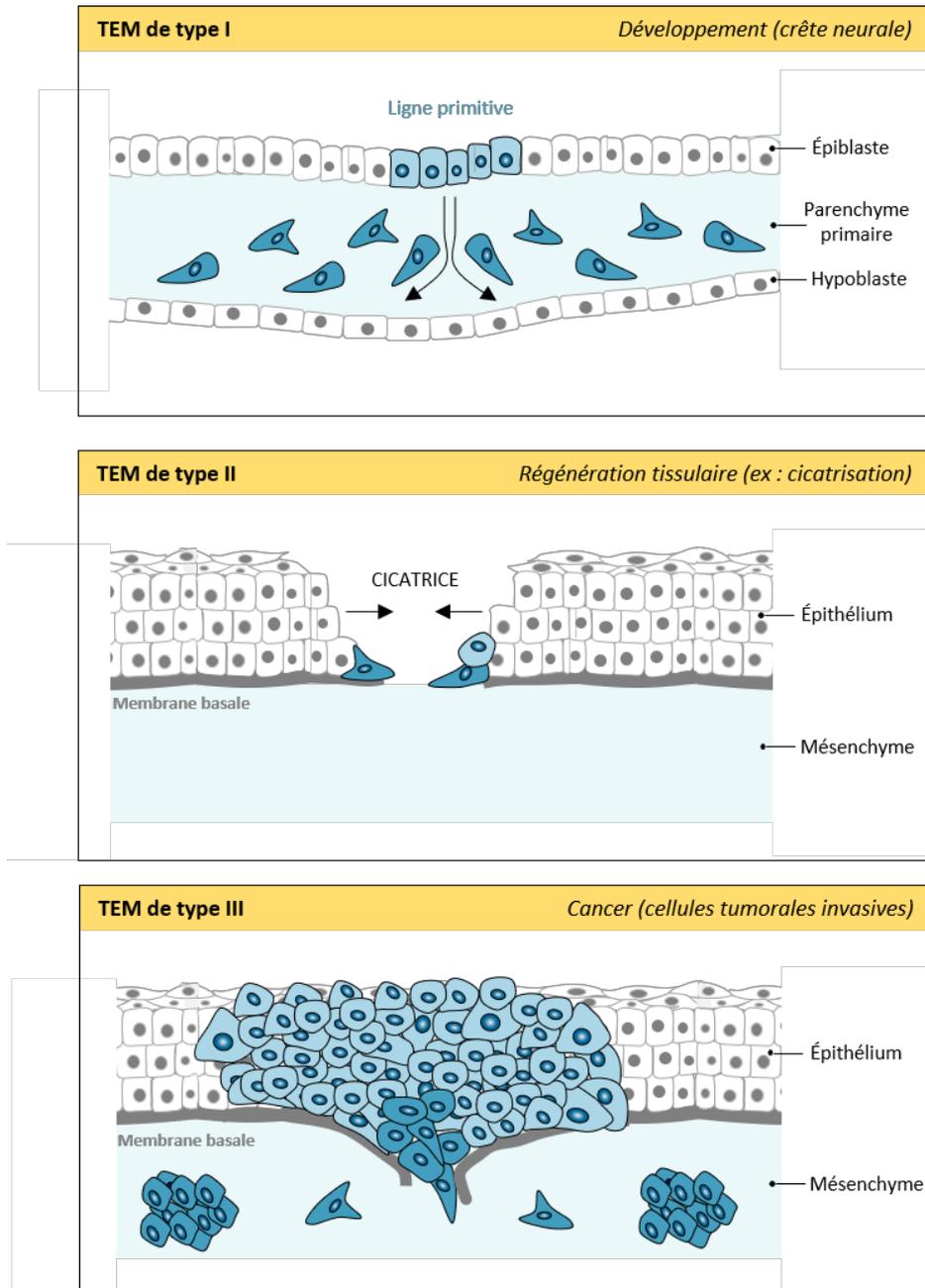


Figure 8 : Les différents types de TEM

Adapté d'après (Angadi Punnya V. and D. 2015, ESMO 2017)

La **TEM de type 3** est impliquée dans la formation de cellules tumorales malignes capables d'envahir les tissus environnants, *via* la circulation sanguine, pour former des métastases. La transformation des cellules épithéliales non invasives en cellules mésenchymateuses invasives se manifeste par diverses caractéristiques tumorales telles que la perte d'adhérence et de polarité cellulaire, parallèlement à l'acquisition de propriétés migratoires et invasives. Tout comme les autres TEM, les cellules invasives disséminées dans un tissu secondaire peuvent entrer en TME pour former une nouvelle masse tumorale épithélialisée (Thiery 2002).

Le processus de TEM arbore donc une série de changements cellulaires et moléculaires complexes, différents en fonction du stade de dédifférenciation cellulaire mais similaires quel que soit le contexte biologique, physiologique ou pathologique (Kim *et al.* 2017).

2.2. Acteurs de la TEM

La TEM est un processus dynamique transitoire et réversible qui engendre une plasticité des cellules épithéliales indispensable à de nombreux processus physiologiques et pathologiques. D'un point de vue spatio-temporel, l'acquisition de propriétés migratoires et invasives par une cellule épithéliale cohésive passe par des phénotypes épithélio-mésenchymateux partiels justifiant une TEM parfois incomplète ou intermédiaire (**Figure 9**).

Les changements phénotypiques induits au cours de la TEM s'apparentent à un phénomène de transdifférenciation, ou dédifférenciation cellulaire, caractérisé par une désorganisation des jonctions intercellulaires, passant par la perte de polarité apico-basale et la déstabilisation de complexes jonctionnels. S'en suit également un remodelage du cytosquelette et une dérégulation d'expression de nombreux facteurs inducteurs de TEM comme des facteurs de transcription ou des molécules protéolytiques de la matrice extracellulaire (MEC) par exemple. Et bien que les différents stades moléculaires qui caractérisent la conversion d'une cellule épithéliale en une cellule de type mésenchymateux ne soient pas encore clairement identifiés, les recherches ont tout de même permis d'établir des **biomarqueurs de la TEM** (Pallet and Anglicheau 2008, Zeisberg and Neilson 2009, Kalluri and Weinberg 2009, Scanlon *et al.* 2013, Jie, Zhang, and Xu 2017). En effet, ces biomarqueurs sont définis par la répression de protéines épithéliales parallèlement à l'acquisition progressive de l'expression de protéines mésenchymateuses (**Tableau 6**). Pour citer un exemple, la protéine du cytosquelette

vimentine a été identifiée comme un marqueur prédictif de présence de métastases dans les carcinomes non-à petites cellules (Dauphin *et al.* 2013).

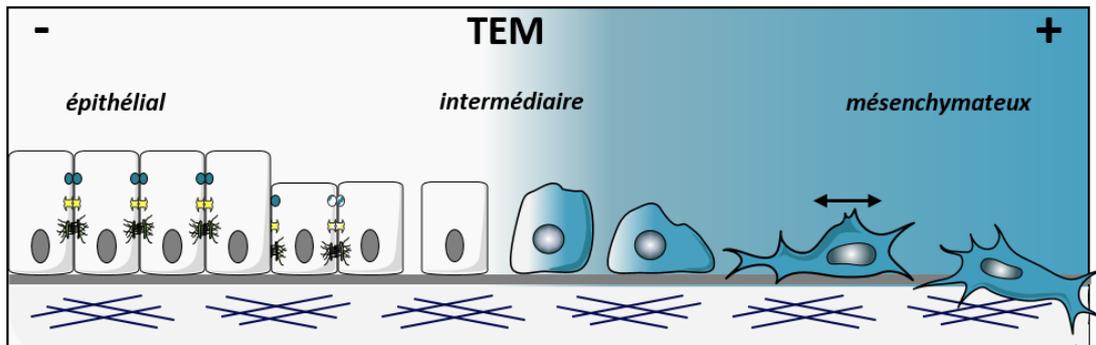


Figure 9 : Les trois phases phénotypiques majeures de la TEM

Marqueurs atténués	Marqueurs surexprimés
Protéines de surface	
Cadhérine-E Claudines Occludine ZO-1	Cadhérine-N Intégrines $\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 6$ Syndécan-1
Protéines du cytosquelette	
Cytokératine	FSP1 α SMA Vimentine Caténine- β
Protéines de la matrice	
Collagène $\alpha 1$ (IV) Laminine 1	Collagènes $\alpha 1$ (I), $\alpha 1$ (III) Fibronectine Laminine 5 MMP-2, -3, -9, -14
Facteurs de transcription	
	SNAIL (Snail1/Snail ; Snail2/Slug) ZEB1 Twist
MicroARNs	
Famille miR-200 miR-124 miR-138	miR10b miR-21

Tableau 6 : Les biomarqueurs de la TEM

Adapté d'après (Zeisberg and Neilson 2009)

Abréviations : FSP1 : Fibroblast-specific protein 1 ; α SMA : α -smooth muscle actin ; SNAIL : Zinc finger protein SNAI; ZEB1 : zinc finger E-box finding homeobox 1

2.2.1. Les jonctions intercellulaires

Le tissu épithélial est mis en place par un ensemble de cellules juxtaposées et solidarisées par des jonctions intercellulaires. Comme leur nom l'indique, ces jonctions sont des structures constituées par un réseau moléculaire permettant la cohésion, l'étanchéité et l'adhérence cellule-cellule. La juxtaposition et l'adhérence des cellules épithéliales reposant sur une lame basale sont maintenues par 4 types de jonctions intercellulaires : les **jonctions serrées** (*zonula occludens*), les **jonctions adhérentes** (*zonula adherens*), les **jonctions communicantes** (*gap junction*) et les **desmosomes** (*macula adherens*) (**Figure 10**).

2.2.1.1. Les jonctions serrées

Les jonctions serrées, aussi appelées *zonula occludens*, assurent la perméabilité paracellulaire et la **polarité apico-basale** de la cellule épithéliale. Ces jonctions, situées au pôle le plus apical, forment un système d'enroulement serré autour de la cellule qui limite la diffusion latérale des protéines entre les cellules. La terminologie des jonctions serrées se réfèrent à cette **ceinture cellulaire** (*zonula*) formée principalement par des protéines occlusives (*occludens*) qui maintiennent l'**étanchéité cellulaire** par formation de « *kissing point* » (Knights *et al.* 2012).

D'un point de vue moléculaire, deux familles de protéines transmembranaires composent les jonctions serrées : les tétraspanines, regroupant les **occludines** (*OCLN*), les **claudines** (*CLDN1-5*) et la tricelluline ; et les immunoglobulines correspondant aux molécules d'adhérence jonctionnelle **JAM** (*JAM1-3*). Structuralement parlant, les tétraspanines possèdent quatre domaines transmembranaires liés par deux boucles extracellulaires dont les domaines N- et C-terminaux sont orientés dans le cytoplasme. Les JAM, quant-à-elles, possèdent un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un petit domaine intracytoplasmique de 45 acides-aminés comportant des motifs de liaison aux domaines PDZ, notamment à celui des protéines accessoires (Hartsock and Nelson 2008).

En effet, les protéines transmembranaires sont reliées au cytosquelette d'actine par plusieurs connecteurs cytoplasmiques sous-membranaires capables d'initier des voies de signalisation impliquées dans la régulation de nombreux gènes (Gonzalez-Mariscal, Tapia, and Chamorro 2008). Parmi eux, les Pals1 (*protein associated with Lin-7 ; PALS1*), les Magi (*MAGUK*

inverted protein ; MAGI1-3) ou encore les protéines Par (*partitioning-defective proteins ; complexe PAR-3/-6*), les Mupp1 (*multi-PDZ domain protein 1 ; MUPP1*), l'afadine (*AF-6*) et les PATJ (*pals1 associated tight junctions protein*) contribuent à la formation de la plaque cytoplasmique des jonctions serrées (Gonzalez-Mariscal *et al.* 2003). L'ensemble de ces complexes est aussi à l'origine de la signalétique des jonctions étanches mais les **protéines accessoires ZO** (*Zonula-Occludens ; ZO1-3*) spécifiques occupent un rôle majeur. Ces *zonula-occludens*, principalement régulés lors de la TEM, constituent l'objet principal de nos recherches et seront développés particulièrement dans la partie III.

2.2.1.2. Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes, aussi appelées *zonula adherens* ou jonctions intermédiaires, assurent l'**ancrage** et le **maintien de l'intégrité** cellulaire. Elles ont une position intermédiaire puisqu'elles sont situées au-dessus des desmosomes mais en dessous des jonctions serrées et reposent sur l'association de protéines transmembranaires aux protéines du cytosquelette d'actine. Les protéines transmembranaires cadhérines et nectines permettent de faire le lien avec les microfilaments d'actine *via* des protéines accessoires, les caténines et l'afadine.

La **cadhérine-E**, dont son expression dépend du gène *CDH1*, est la protéine transmembranaire majeure retrouvée dans ces jonctions. Elle est responsable de l'adhérence intercellulaire en initiant les contacts avec les cadhérines des cellules avoisinantes (Watanabe, Sato, and Kaibuchi 2009). D'autres types de cadhérines existent, comme les cadhérines -N, -P et -R, et leurs expressions diffèrent en fonction du type cellulaire (Hulpiau and van Roy 2009). En effet, l'expression de la cadhérine-E, élevée dans les cellules épithéliales cohésives, est diminuée au profit de l'expression de la cadhérine-N dans des cellules présentant un phénotype mésenchymateux (Gheldof and Berx 2013). La famille des cadhérines partage des similarités structurales, proche de celle de la cadhérine-E, qui comporte cinq domaines extracellulaires, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire, composé d'une région de liaison aux caténines (Hartsock and Nelson 2008). Les **caténines** sont les protéines sous-membranaires majoritairement retrouvées dans les jonctions adhérentes et se divisent en 3 sous-groupes : la caténine p120 (*CTND1-2*), la caténine- α (*CTNNA1-3*) et la caténine- β (*CTNNB1*) (Zhao, Reynolds, and Gaucher 2011). Les différentes caténines assurent le lien entre les cadhérines et les microfilaments d'actine. D'un point de vue structural, la plupart des

caténines possèdent des séquences à répétition *armadillo*⁵ qui leur permettent d'interagir avec d'autres protéines (Hartsock and Nelson 2008). Bien que plusieurs complexes interviennent dans la mise en place de la barrière épithéliale (nectines/afadine, cadhérines/caténines), le plus étudié reste le complexe **cadhérine-E/caténine-β**. En effet, en condition normale, la caténine-β est une protéine sous-membranaire, liée à la cadhérine-E dans les jonctions adhérentes. En revanche, en condition de stimulation par des facteurs de croissance tel que le TGF-β par exemple, la caténine-β se délocalise et s'accumule alors dans le cytoplasme : une partie sera dégradée par le protéasome ; une autre partie sera transloquée dans le noyau. La caténine-β nucléaire co-FT (cofacteur de transcription), est alors capable de se lier aux facteurs TCF/LEF, réprimant l'expression de la cadhérine-E mais aussi des claudines et occludines (Tian *et al.* 2011, Knights *et al.* 2012). Ces complexes protéiques interviennent d'ailleurs activement dans le processus de TEM.

2.2.1.3. Les jonctions communicantes

Aussi connus sous le nom de « *gap junctions* », les jonctions communicantes ou *macula communicans* permettent le passage d'ions et de petites molécules entre deux cellules adjacentes. Ces jonctions sont composées de canaux qui traversent les deux membranes plasmiques, permettant une communication intercellulaire directe. Ces canaux sont mis en place par des protéines transmembranaires appelées connexines, capables de s'assembler en hexamère pour former un connexon. Un connexon est composé par six connexines et une jonction communicante est composée par deux connexons, homo- ou hétéromériques, traversant chacun la membrane plasmique d'une cellule, à l'origine de canaux bidirectionnels. L'association de deux connexons identiques est qualifiée d'homotypique tandis que l'association de deux connexons différents est qualifiée d'hétérotypique. Il existe près de 21 isoformes de connexine dans le génome humain. Chaque connexine possède une structure similaire de deux boucles extracellulaires, quatre domaines transmembranaires et une boucle intracellulaire composant la partie cytoplasmique avec les domaines N- et C-terminaux (Meşe, Richard, and White 2007). Bien plus qu'une simple communication intercellulaire, ces nexus sont aussi impliqués dans la régulation de nombreux mécanismes notamment le maintien de

⁵ Les **répétitions *armadillo*** correspondent à une séquence répétée d'une quarantaine d'acides aminés caractéristique d'un type de structure particulier et notamment une paire d'hélice α

l'homéostasie tissulaire, du pH intracellulaire mais aussi la transmission de signaux intercellulaires (Nielsen *et al.* 2012). L'ensemble de ces propriétés témoigne du rôle central des « *gap junctions* » dans la synchronisation et la communication entre les cellules, processus pouvant être dérégulés dans divers phénomènes pathologiques. En effet, la diminution des connexines, notamment au cours de la TEM, altère la fonctionnalité des communications intercellulaires (Chun and Hanahan 2010, Peinado, Olmeda, and Cano 2007, Bax *et al.* 2011) .

2.2.1.4. Les desmosomes

Les jonctions desmosomales, aussi qualifiées de *macula adherens*, ont un rôle d'ancrage cellulaire facilitant la liaison de la membrane plasmique avec les filaments intermédiaires du cytosquelette. Elles favorisent la **résistance tissulaire** en maintenant une liaison robuste entre les cellules. Les desmosomes sont mis en place par des protéines transmembranaires hétérodimériques, les desmocollines (*DSC1-3*) et les desmoglénines (*DSG1-4*) de la famille des cadhérines, capables de former une **plaque desmosomale dense** (Knights *et al.* 2012) . Dans les cellules épithéliales, le domaine intracytoplasmique de ces cadhérines est capable de se fixer aux molécules sous-membranaires desmoplakines (*DSP*), plakoglobines (*JUP*) et plakophilines (*PKP1-4*) les reliant ainsi aux filaments intermédiaires de kératine (Kowalczyk and Green 2013). Des études ont d'ailleurs mis en évidence l'influence des facteurs de transcription de la TEM dans la régulation des gènes desmosomaux *via* la perte d'expression progressive de la desmoplakine (Chun and Hanahan 2010, Peinado, Olmeda, and Cano 2007, Bax *et al.* 2011)

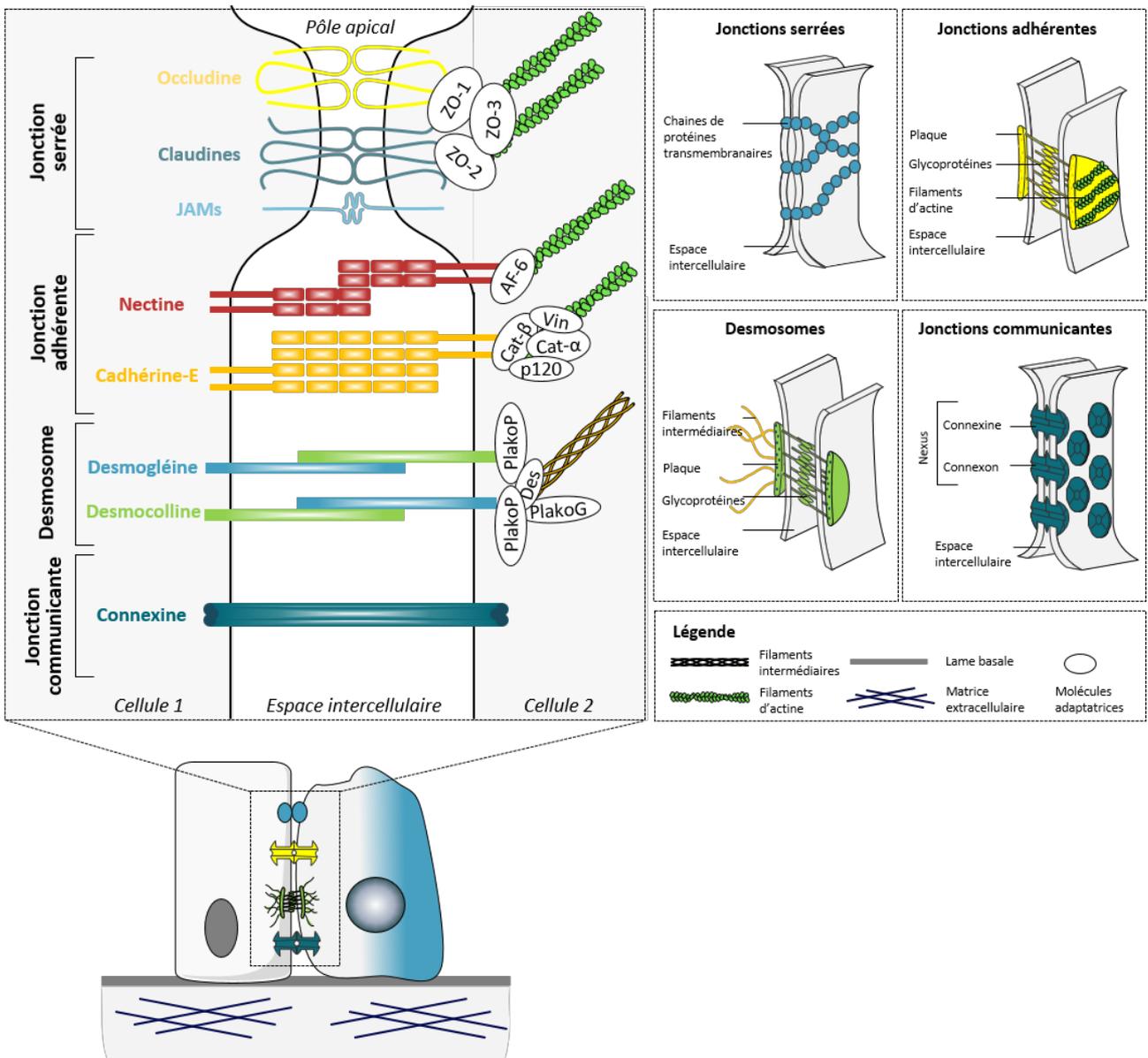


Figure 10 : Les différentes jonctions intercellulaires épithéliales

Adapté d'après (Lamouille, Xu, and Derynck 2014, Matter and Balda 2003)

2.2.2. Le cytosquelette

Le cytosquelette est un ensemble de structures macromoléculaires fibreuses, présentes dans le cytoplasme et le noyau, ayant pour fonction de maintenir la forme de la cellule, d'adapter sa motilité et de répartir son organisation interne. Trois types de filaments protéiques majeurs interviennent dans le cytosquelette cellulaire : les filaments d'actine ou microfilaments (7 à 9 nm de diamètre), les filaments intermédiaires (10 nm de diamètre) et les microtubules (25 nm de diamètre) (**Figure 11**). Ces éléments se retrouvent aussi bien sous la forme de monomères que de polymères et peuvent être stables ou labiles en fonction de leur utilité dans le fonctionnement de la cellule.

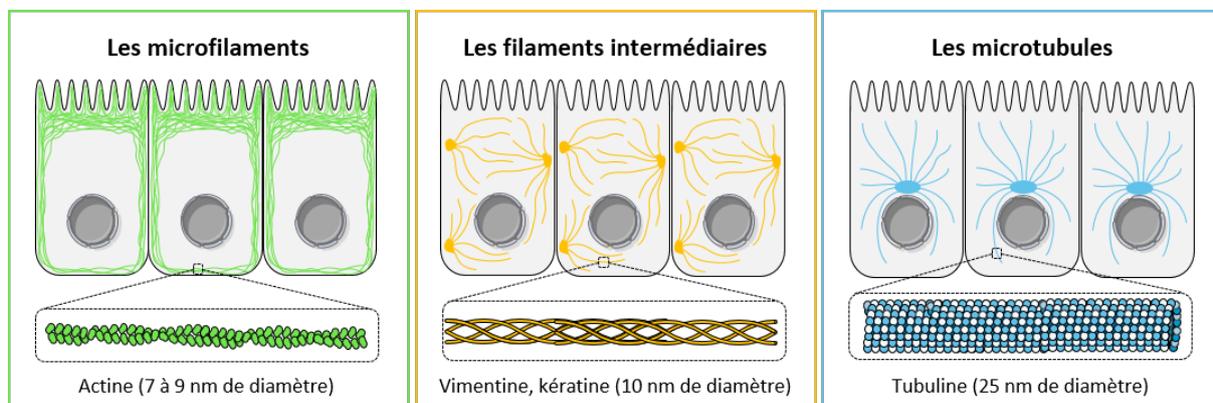


Figure 11 : Les composants du cytosquelette et de leur distribution cellulaire

Au cours de la TEM, les éléments du cytosquelette subissent des réarrangements en faveur de la motilité cellulaire. Les microfilaments d'actine se réorganisent en fibres de stress permettant la formation de protrusions et d'extensions membranaires, responsables du mouvement cellulaire, qualifiées respectivement de lamellipodes et de filopodes (Ridley 2011). De la même façon, certaines cellules tumorales développent des invadopodes, structures responsables de l'invasion cellulaire par dégradation de la matrice extracellulaire (Bravo-Cordero, Hodgson, and Condeelis 2012). Également impliquée dans la formation de structures protrusives, la réorganisation spatiale des microtubules déstabilise les complexes jonctionnels à l'origine de la polarité épithéliale et joue un rôle important dans la motilité des cellules mésenchymateuses durant la TEM (Nalluri, O'Connor, and Gomez 2015). Ces changements dynamiques organisationnels sont majoritairement régulés par de petites

protéines G, les Rho-GTPases. En effet, Rac1 et Cdc42 permettent la polymérisation de l'actine et des microtubules, et favorisent la formation de protrusions membranaires impliquées dans l'étalement et la motilité cellulaire. De même, la protéine RhoA est à l'origine de la formation des fibres de stress (Lamouille, Xu, and Derynck 2014, Ungefroren, Witte, and Lehnert 2018). Concernant les filaments intermédiaires, les cellules épithéliales en TEM présentent un changement au niveau de leur composition. En effet, l'expression des kératines et cytokératines diminue tandis que l'expression de la vimentine augmente (McGrail *et al.* 2015, Kim *et al.* 2017). La vimentine, biomarqueur de la TEM, est un filament intermédiaire de type III qui joue un rôle important dans les mécanismes d'adhérence, de signalisation et de migration cellulaire (Kidd, Shumaker, and Ridge 2014, Gilles *et al.* 1999).

L'ensemble de ces réarrangements de l'architecture interne du cytosquelette modifie les capacités migratoires des cellules en TEM en modifiant leur forme et leur étalement cellulaire par formation de structures protrusives importantes favorisant une polarité front-arrière de la cellule à défaut d'une polarité apico-basale.

2.2.3. La matrice extracellulaire (MEC)

La matrice extracellulaire, aussi appelée la MEC, joue également un rôle primordial dans la progression tumorale. La MEC constitue un réseau complexe organisé de macromolécules extracellulaires, capables d'influencer la prolifération, la survie, la différenciation et la migration des cellules environnantes (Hynes 2009). Ce réseau diversifié de protéines architecturales est composé de trois types de molécules majeures : les **protéines fibreuses**, associées à l'élastine et aux collagènes ; les **glycoprotéines**, telles que la fibronectine ou la laminine ; et les **glycosaminoglycanes** capables de se fixer à d'autres protéines pour former des protéoglycanes (Frantz, Stewart, and Weaver 2010). Le rôle de la MEC dans la progression tumorale, associé au phénomène de TEM, ne fait plus aucun doute depuis des décennies. En effet, les capacités de dégradation de la MEC par les cellules épithéliales ne résultent pas seulement d'un dysfonctionnement cellulaire individuel mais aussi des interactions avec les cellules du microenvironnement et les protéines extracellulaires.

Le **collagène**, étroitement lié à la TEM, représente le constituant structural majeur de la MEC avec 28 membres (I à XXVIII) collaborant à la résistance des tissus. Au cours de la TEM, le collagène I est capable d'inhiber l'expression de la protéine épithéliale cadhérine-E en

faveur de la protéine mésenchymateuse cadhérine-N (Imamichi and Menke 2007, Shintani *et al.* 2006). Ces modulations d'expression sont d'ailleurs à mettre en lien avec l'activation des **intégrines**, protéines exprimées sous forme de dimère α (18 membres) et β (8 membres) dont l'association détermine les interactions cellule-matrice. L'intégrine $\alpha2\beta1$, capable de se lier au collagène, joue notamment un rôle dans la migration des cellules métastatiques (Koistinen and Heino 2013).

Une étude de Park et Schwarzbauer a également montré l'importance de la fibronectine dans la TEM. En effet, la surexpression de la **fibronectine** dans les cellules épithéliales tumorales mammaires et pulmonaires favorise la régulation positive de l'expression de la vimentine, la cadhérine-N et Snail (Park and Schwarzbauer 2014). A l'inverse, une perte d'expression du syndecan-1 de la famille des **protéoglycanes** est étroitement corrélée à la diminution d'expression de la cadhérine-E, en faveur du développement d'un phénotype mésenchymateux par les cellules cancéreuses colorectales (Mitselou *et al.* 2016).

Enfin, la dégradation de la MEC par les cellules épithéliales dépend également de la surexpression de protéases matricielles, notamment les **MMPs**. Ces métalloprotéases se retrouvent fréquemment activées dans plusieurs cancers, notamment celui du poumon (Merchant *et al.* 2017). En effet, de nombreuses études ont mis en évidence un lien entre la TEM et la surexpression des gélatinases MMP-2 et -9 ainsi que les MMPs -3, -13 et -14 (Bonnomet *et al.* 2008, Nawrocki-Raby *et al.* 2003, Gialeli, Theocharis, and Karamanos 2011).

En outre, certaines protéines matricielles peuvent également être clivées au cours de la progression tumorale, donnant naissance à de petits fragments capables d'exercer une activité biologique pro-tumorale : il s'agit des **matrikines** (Maquart *et al.* 2004).

Au final, les changements de composition de la MEC et la mise en place de nouvelles interactions cellule-matrice démontrent l'importance des protéines extracellulaires dans les mécanismes et la régulation de la TEM.

2.2.4. Les régulateurs de la TEM

La TEM est régie par des mécanismes moléculaires complexes qui font intervenir plusieurs voies de signalisation et notamment divers facteurs de croissance et facteurs de transcription. Les facteurs de croissance solubles agissent souvent au niveau des récepteurs à tyrosine kinases et jouent généralement un rôle en amont de la régulation. Parmi eux, plusieurs

familles sont impliquées telles que le TGF- β (*Transforming Growth Factor*), l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), le FGF (*Fibroblast Growth Factor*), le VEGF (*Vascular endothelial Growth Factor*), l'HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) et l'IGF-1 (*Insulin Growth Factor*) (Thiery *et al.* 2009, Kalluri and Weinberg 2009, Skrypek *et al.* 2017). Ces facteurs, associés à d'autres molécules extracellulaires comme Wnt, Notch ou encore Hedgehog, sont capables d'activer des voies de signalisation qui régissent de nombreuses propriétés cellulaires biologiques. Par exemple, la voie des MAPK/ERK, la voie PI3K/Akt, la voie Wnt/caténine- β , la voie des Smads, la voie Notch et la voie NF- κ B peuvent être citées (Polyak and Weinberg 2009, Scanlon *et al.* 2013). Ces différentes voies sont elles-mêmes à l'origine de l'expression de facteurs de transcription (FT) impliqués dans la TEM, mais également de leur régulation post-transcriptionnelle et/ou post-traductionnelle. Pour la plupart, ces FT appartiennent à trois familles majeures : les familles à doigt de zinc SNAIL (SNAI1/Snail et SNAI2/Slug) et ZEB (ZEB1 et ZEB2) pour *zinc finger E-box binding*, et la famille TWIST (TWIST1 et TWIST2) présentant une structure en hélice-boucle-hélice (bHLH) (Peinado, Olmeda, and Cano 2007, Thiery and Sleeman 2006, De Craene and Berx 2013). De façon générale, la transition débute par l'expression de Snail1 suivie par celles de Slug, des Zeb et Twist qui interviennent plutôt dans le maintien du phénotype mésenchymateux (Peinado, Olmeda, and Cano 2007). Ces facteurs sont capables de réguler de façon coopérative la réponse des gènes associés à la TEM, comme par exemple la cadhérine-E et la vimentine (**Tableau 7**).

	Protéines réprimées	Protéines activées
SNAIL	Claudines, Occludine, cadhérine-E, Desmoplakine, Plakophiline, Crumbs3, PALS1, PATJ, Cytokeratines	Fibronectine, Vitronectine, cadhérine-N, Collagène, MMPs, TWIST, ZEB
TWIST	Claudines, Occludine, cadhérine-E, Desmoplakine, Plakoglobine	Fibronectine, Vitronectine, cadhérine-N, SPARC, Intégrine α 5
ZEB	ZO-1, cadhérine-E, Plakophiline, Crumbs3	Vitronectine, cadhérine-N, MMPs

Tableau 7 : Régulation des protéines par les trois familles de FT de la TEM

Adapté d'après (Lamouille, Xu, and Derynck 2014)

En effet, ces FT sont capables de réprimer l'expression du gène CDH1 en se fixant à des séquences *E-box* de l'ADN (5'-CACCTG-3'), à l'origine de l'inhibition de l'expression de la protéine épithéliale la cadhérine-E (Cano *et al.* 2000, Hajra, Chen, and Fearon 2002, Vesuna *et al.* 2008). Les FT ne sont d'ailleurs pas les seuls à réguler l'expression des différents gènes impliqués dans la TEM. En effet, des régulateurs des FT eux-mêmes jouent également un rôle primordial : il s'agit des microARN (miARN). Certains miARN ciblent l'expression de protéines épithéliales ou mésenchymateuses tandis que d'autres ciblent directement l'expression des FT impliqués dans la TEM (Zaravinos 2015). En lien, des études ont mis en évidence le rôle d'inhibiteur de TEM du miR-138, facteur capable d'empêcher l'expression de la vimentine tout en surexprimant la cadhérine-E dans les cancers du sein (Zhang *et al.* 2016). De plus, d'autres recherches ont montré l'implication des microARN dans la régulation des FT Snail, Zeb et Twist et notamment que l'expression de miR-124 est inversement corrélée à celle de Slug (Cui and Hu 2016) tandis que le miR-200 cible l'expression de Zeb1 et Zeb2 (Nishijima *et al.* 2016) dans les CBNPC.

Dans un contexte tumoral, l'ensemble de ces complexes moléculaires est donc indispensable et/ou complémentaire et suffit à favoriser un phénotype mésenchymateux présentant des capacités cellulaires motiles et invasives.

3. La TEM dans la progression tumorale

L'implication de la TEM dans la progression tumorale est étudiée depuis maintenant plusieurs décennies. L'**hétérogénéité tumorale** et la **plasticité des cellules tumorales** sont d'ailleurs les principales propriétés cancéreuses analysées à travers ce processus et ces études reposent sur deux grands principes. L'un participe à la caractérisation moléculaire et phénotypique d'une cellule TEM positive tandis que l'autre tend à analyser le comportement d'une cellule TEM positive à travers différentes étapes de la progression tumorale.

D'une part, la conversion métastatique des cellules épithéliales tumorales, associée au phénomène de TEM, est basée sur la **caractérisation de biomarqueurs**, favorisant les capacités migratoires et invasives des cellules épithéliales (Zeisberg and Neilson 2009). En effet, la majeure partie de la caractérisation d'une cellule tumorale métastatique est basée sur la recherche d'**expression de marqueurs mésenchymateux**, tels que la vimentine, α -SMA, ou encore les FT SNAIL/ZEB/TWIST (Zeisberg and Neilson 2009), associés à la **répression de**

marqueurs épithéliaux tels que la cadhérine-E (Berx and van Roy 2009, Nawrocki-Raby *et al.* 2003). Des études *in vivo* murines nous ont d'ailleurs permis de montrer un lien entre l'établissement d'une TEM, le phénomène d'intravasation des cellules tumorales et la propagation des CTCs, à travers la caractérisation de l'expression de marqueurs tels que la vimentine et les FT Snail/Slug/Zeb1 (Drake *et al.* 2009, Bonnomet *et al.* 2010, Francart *et al.* 2018). De plus, Fischer KR *et al.* a développé un modèle murin triple transgénique placé sous le contrôle du promoteur de FSP-1, permettant la visualisation des cellules épithéliales « RFP+ » en rouge vs mésenchymateuses « GFP+ » en vert. Ce système de « *tracing* » des cellules en TEM a permis de mettre en évidence que FSP-1 n'est pas une protéine indispensable à la formation de métastases dans les cancers mammaires (Fischer *et al.* 2015). Des études ont également révélé que le profil d'expression de ces différents biomarqueurs est régulé différemment tout au long du processus de TEM, suggérant une intervention de ces facteurs à différents stades de la progression tumorale (Li *et al.* 2013, Karacosta, Bendall, and Plevritis Dec 2017).

D'autre part, les cellules cancéreuses présentant un phénotype de TEM complète ou partielle sont capables de détourner, à leur profit, de nombreuses voies de signalisation en faveur de la progression tumorale. Dans ce sens, des études ont d'ailleurs mis en évidence l'implication des facteurs ZEB1 et TWIST1 dans les phénomènes d'extravasation et de **formation de métastases** (Drake *et al.* 2009, Stoletov *et al.* 2010). De plus, différents modèles murins ont démontré l'importance de la TEM dans le développement de métastases et la **dissémination des CTCs** dans un contexte mammaire et pulmonaire (Bonnomet *et al.* 2012, Tsai *et al.* 2012). En effet, l'étude du profil d'expression des CTCs a montré l'expression de marqueurs, tels que la vimentine et les FT Snail/Slug/Zeb1, dans le phénomène d'intravasation des cellules tumorales associé à l'établissement de CTCs (Drake *et al.* 2009, Bonnomet *et al.* 2010, Francart *et al.* 2018). Une récente étude de Bourcy *et al.* a mis en évidence la persistance des CTCs « TEM+ » par l'expression augmentée du facteur tissulaire (TF) en faveur de capacités pro-coagulantes. De cette manière, les CTCs sont capables de se protéger à l'aide d'un cocon formé par l'association de plaquettes et de fibrine, facilitant la migration des cellules tumorales vers d'autres organes (Bourcy *et al.* 2016). Par ailleurs, les cellules tumorales influencées par la TEM peuvent également augmenter leur **survie cellulaire** en résistant aux signaux apoptotiques. Des études ont d'ailleurs mis en évidence l'implication du

facteur de transcription Snail dans l'activation des voies MAPK/ERK et PI3K impliquées dans la survie cellulaire et la **résistance à l'apoptose** (Barrallo-Gimeno and Nieto 2005). L'**autophagie** peut également jouer un rôle dans la forte résistance des cellules mésenchymateuses. En effet, les cellules de carcinomes mammaires en TEM utilisent l'autophagie comme un moyen d'échapper à la surveillance immunitaire (Akalay *et al.* 2013). Les cellules tumorales présentant une TEM peuvent ainsi accélérer la dissémination métastatique par des mécanismes d'**échappement au système immunitaire**. Nous avons d'ailleurs contribué à montrer que les cellules « TEM+ » présentent une expression accrue de facteurs solubles pro-angiogéniques et pro-inflammatoires tels que les interleukines 6 et 8 (IL-6 et IL-8) et le GM-CSF, favorables au recrutement des cellules immunosuppressives (Suarez-Carmona *et al.* 2015) (section Intro - IV.2.2). La production de facteurs capables d'inhiber la réponse immune par ces cellules leur confèrent par ailleurs une **résistance à l'immunothérapie** (Li *et al.* 2009). En effet, une récente publication de Chae *et al.*, met en évidence une corrélation inverse entre la TEM et l'infiltration de cellules T dans les CBNPC (Chae *et al.* 2018). L'émergence des cellules T régulatrices (Treg) et du ligand PD-L1 fait aussi l'objet de nombreuses études, à l'origine de l'immunosuppression tumorale (Thompson *et al.* 2004, Okazaki *et al.* 2013, Kudo-Saito *et al.* 2009, Nieto *et al.* 2016).

De la même façon, la régulation de l'expression des *zonula occludens* au cours de la progression tumorale influence la signalétique intracellulaire et les capacités métastatiques des cellules tumorales. L'objet principal de nos travaux portant principalement sur ce point, nous le développerons davantage dans la partie suivante.

PARTIE III

Les protéines *zonula occludens* (ZO_s)

III. Les protéines *zonula occludens* (ZOs)

1. Structure des *zonula occludens*

1.1. Famille des protéines MAGUK

Les protéines ZO appartiennent à la famille des MAGUK (*membrane associated guanylate kinase homologs*) qui présentent des domaines de liaison aux protéines des jonctions adhérentes et/ou serrées. Les MAGUK regroupent une famille de protéines comportant une structure commune de trois domaines conservés : un domaine PDZ, un domaine SH3 et un domaine GK (Gonzalez-Mariscal, Betanzos, and Avila-Flores 2000) (**Figure 12**).

Le **domaine PDZ**, constitué de 80 à 90 acides aminés, tient son nom d'un acronyme de trois protéines dans lesquelles cette structure conservée a été décrite initialement : il s'agit de PSD-95 (*postsynaptic density protein*), Dlg-A (*Drosophila tumor suppressor*) et ZO-1 (*zonula occludens-1*). Ce domaine, exprimé en trois copies dans les ZOs, permet non seulement l'ancrage des protéines transmembranaires à la membrane mais également la liaison avec d'autres protéines (Kim *et al.* 1995). Ces interactions protéine-protéine sont réversibles et se font soit par reconnaissance d'une séquence spécifique d'acides aminés, soit par dimérisation (Tian *et al.* 2011) (**Tableau 8**). Par exemple, dans les jonctions serrées le second domaine PDZ de ZO-1 est capable de former des complexes indépendants ZO-1/ZO-2 et ZO-1/ZO-3 par liaison au second domaine PDZ de ZO-2 et ZO-3 (Wittchen, Haskins, and Stevenson 1999).

Motif de la séquence en C-terminal reconnu par les domaines PDZ				
Classe du motif	P ₋₃	P ₋₂	P ₋₁	P ₀
Classe I	X	S/T	X	φ
Classe II	X	φ	X	φ
Classe III	X	D/E X	X X	Φ C

Tableau 8 : Les séquences d'interaction des domaines PDZ

Abréviations : P₀ : acide aminé carboxy-terminal ; φ : acide aminé hydrophobe ; X : acide aminé quelconque

Le **domaine SH3** (*Src homology 3*) est une région de 55 à 70 acides aminés, dont son patronyme dépend de son homologie avec une région du produit de l'oncogène v-Src (Dalgarno, Botfield, and Rickles 1997). Ce domaine non catalytique favorise les interactions protéiques par liaison des séquences peptidiques riches en proline (PXXP) et intervient également dans la régulation d'activité enzymatique par formation de complexes enzyme/substrat (Cohen, Ren, and Baltimore 1995).

Le **domaine GK** (*Guanylate Kinase*) est l'homonyme de l'enzyme guanylate kinase qui permet la conversion du GMP en GDP en présence d'ATP (McGee *et al.* 2001). La séquence d'acides aminés responsable de ce domaine présente cependant une inactivité enzymatique. En effet, il s'avère que les protéines des jonctions serrées qui présentent le domaine GK, ne pouvant lier ni le GMP ni l'ATP, interagissent avec les autres protéines indépendamment de cette activité catalytique prédictive (te Velthuis, Admiraal, and Bagowski 2007).

Ces trois structures conservées sont donc partagées par l'ensemble des membres de la famille des MAGUKS et notamment les protéines ZO.

1.2. Membres de la famille des ZO

1.2.1. *Zonula occludens 1* (ZO-1)

La protéine *zonula occludens 1* (ZO-1) est la première protéine ZO découverte en 1986 par Goodenough *et al.* dans les épithélia murins (Stevenson *et al.* 1986). Cette protéine jonctionnelle imposante de 210 à 225 kDa arbore une localisation sub-membranaire dans les jonctions serrées des cellules épithéliales et endothéliales. L'épissage alternatif de ZO-1 est à l'origine de trois isoformes différentes α ($\alpha+$ et $\alpha-$), β ($\beta1$ et $\beta2$) et γ . Ce sont les isoformes $\alpha+$ et $\alpha-$ qui sont exprimées de façon abondante dans les épithélia et les endothélia humains (Gonzalez-Mariscal *et al.* 1999, Balda and Anderson 1993). La protéine ZO-1, appartenant à la famille des MAGUK, contient trois domaines PDZ, un domaine SH3, un domaine GK et des régions PR (*proline rich domain*) qui sont tous impliqués dans la formation de complexes protéiques importants (section Intro - III.2). Un domaine ZU5 (*ZO-1/Unc5c domain*) est exclusivement retrouvé à l'extrémité N-terminale de ZO-1 (Gonzalez-Mariscal, Betanzos, and Avila-Flores 2000, Gonzalez-Mariscal *et al.* 2003, Hartsock and Nelson 2008). Chacun de ces domaines est séparé par des régions variables uniques notées U1 à U6 (**Figure 12**). *In silico*, des analyses de la séquence de ZO-1 ont révélé trois séquences NLS (*Nuclear Localization*

Signal) et cinq NES (*Nuclear Export Signal*) permettant la délocalisation de ZO-1 au niveau des compartiments cytoplasmique et nucléaire (Gottardi *et al.* 1996, Gonzalez-Mariscal *et al.* 1999). En effet, ZO-1 est relocalisé dans le cytoplasme, dans des cellules qui ne forment pas de jonctions intercellulaires comme les fibroblastes par exemple (Itoh *et al.* 1993) (section Intro - III.3).

1.2.2. *Zonula occludens 2 (ZO-2)*

La protéine *zonula occludens 2 (ZO-2)*, second membre identifié, a été mise en évidence en 1991 par Gumbiner *et al.* à partir d'une immunoprécipitation de ZO-1 (Gumbiner, Lowenkopf, and Apatira 1991). ZO-2 est une protéine de 160 kDa qui possède une région d'épissage alternatif à l'origine de deux isoformes majeures A et C (Chlenski *et al.* 1999). Bien que la taille diffère par rapport à ZO-1, ZO-2 présente une structure similaire à celle de ZO-1 à l'exception de la perte du domaine ZU5 en C-terminal (**Figure 12**) (Gonzalez-Mariscal, Betanzos, and Avila-Flores 2000, Gonzalez-Mariscal *et al.* 2003). Tout comme ZO-1, les domaines conservés interviennent dans l'établissement de nombreux complexes moléculaires associant à la fois des partenaires membranaires et cytoplasmiques. Des séquences NLS et NES sont également à l'origine de nouvelles interactions protéiques associées à ZO-2 et notamment avec les facteurs de transcription Fos, Jun et C/EBP (Islas *et al.* 2002, Betanzos *et al.* 2004, Gonzalez-Mariscal *et al.* 2006).

1.2.3. *Zonula occludens 3 (ZO-3)*

Le dernier membre des *zonula occludens* identifié à ce jour est la protéine *zonula occludens 3*, découverte de la même manière que ZO-2, comme co-immunoprécipitant avec le complexe ZO-1/ZO-2, uniquement par l'intermédiaire de ZO-1, en 1993 par Balda *et al.* (Balda and Anderson 1993). D'un point de vue taxonomique, ZO-3, tout comme ZO-2, est issue de ZO-1 qui a perdu son domaine ZU5 (de Mendoza, Suga, and Ruiz-Trillo 2010). Contrairement aux autres membres, cette protéine de 130 kDa ne possède pas de région d'épissage alternatif (Haskins *et al.* 1998). De même, ZO-3 est le seul membre à exprimer une région riche en proline entre ses domaines PDZ2 et PDZ3 (**Figure 12**). Bien que ZO-3 possède des séquences NLS et NES, la fonction associée à sa localisation nucléaire potentielle reste à ce jour méconnue (Gonzalez-Mariscal, Betanzos, and Avila-Flores 2000).

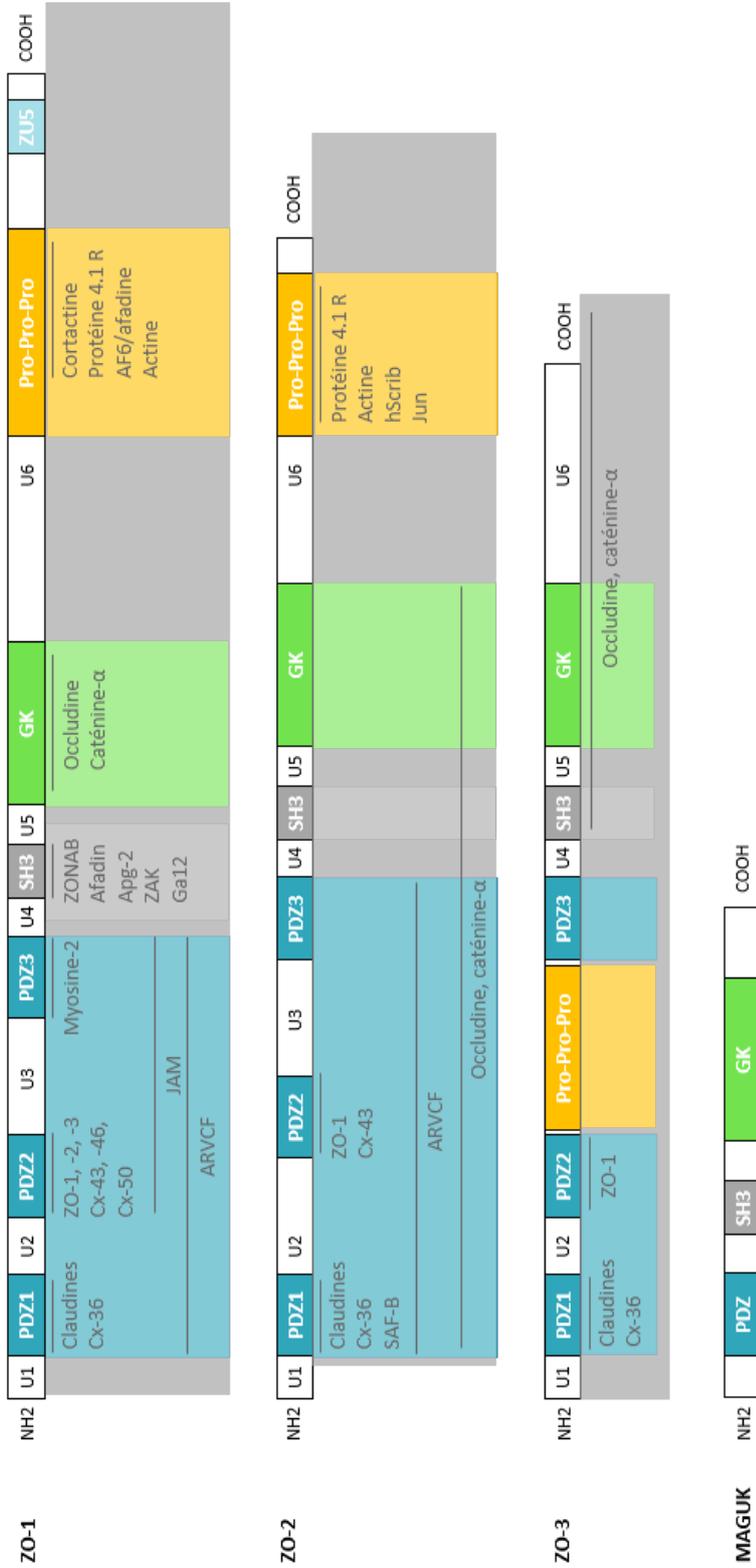


Figure 12 : Les structures en domaine des ZO et des partenaires protéiques associés

(ZO-1,-2 et -3) Le nom de chaque domaine est inscrit dans les différents cadres représentant la structure schématisant de ZO-1, -2 et -3. Le nom des protéines associées aux ZO est inscrit en dessous de chaque structure, délimité par un segment illustrant la surface d'interaction. (MAGUK) Schématisation de la structure commune aux protéines MAGUK. Schéma adapté d'après (Bauer H et al, 2010).
Abréviations : AF-6 : ALL-1 fusion partner at chromosome 6, Ga12 : G protein α 12subunit ; GK : Guanylate kinase-like domain ; JAM : Junction adhesion molecule ; ARVCF : Armadillo Repeat gene deleted in Velo-Cardio-Facial syndrome ; hScrib : human Scribble ; PATJ : Protein associated with tight junctions ; Pro-Pro-Pro : Proline-rich region ; Apg-2 : (ATP and peptide-binding protein in germ cell)-2 ; Cx : Connexin ; PDZ : Psd95/discs large/zonula-occludens-1 domain ; SAF-B : Scaffold attachment factor-B ; SH3 : Src homology3 domain ; U1-U6 : unique variable domains ; ZAK : ZO-1 associated kinase ; ZONAB : ZO-1 associated nucleic acid binding protein ; ZU5 : Unc5-like receptors

2. Fonctions des *zonula occludens*

2.1. Rôle canonique des *zonula occludens*

Les *zonula-occludens*, comprenant ZO-1, -2 et -3, sont des protéines sous-membranaires des jonctions serrées à l'origine de la formation de plaques jonctionnelles, et sont essentielles au développement embryonnaire. En effet, Xu *et al.* a montré le caractère létal de la délétion de ZO-1 et/ou ZO-2 dans le développement embryonnaire *in vivo* murin (Xu *et al.* 2008, Katsuno *et al.* 2008). En revanche, ZO-3 n'est pas indispensable à la survie embryonnaire, suggérant une substitution fonctionnelle par d'autres ZO (Xu *et al.* 2008, Adachi *et al.* 2006).

Ces protéines dites « *scaffold* » contribuent à l'**assemblage de protéines transmembranaires et cytoplasmiques** intervenant dans la mise en place des jonctions serrées mais également celle des jonctions adhérentes (Anderson *et al.* 1988, Howarth, Hughes, and Stevenson 1992). En effet, les ZO sont capables d'interagir avec les protéines des jonctions serrées comme l'occludine, les claudines et les JAMs mais aussi de s'associer avec la caténine- α , la caténine p120 et l'AF-6 (Ebnet *et al.* 2000, Itoh *et al.* 1997). Par exemple, ZO-1 interagit avec les claudines grâce à son domaine PDZ1, se lie à ZO-2 et ZO-3 par son domaine PDZ2 et s'associe aux protéines JAM par ses domaines PDZ2/3, SH3 et GK (Itoh *et al.* 1999) et à l'occludine *via* son motif U5 (Schmidt *et al.* 2004, Fanning *et al.* 2007). De plus, une étude a montré, l'importance du domaine SH3 de ZO-1 dans l'assemblage des jonctions serrées dans les cellules épithéliales (McNeil, Capaldo, and Macara 2006) (**Figure 12**). La forte capacité d'interaction protéique des ZO implique également l'association avec des protéines du cytosquelette par liaison directe des filaments d'actine mais aussi indirecte par reconnaissance de protéines liant l'actine et la myosine telles que la cortactine, la protéine 4.1R ou encore la cinguline (Katsube *et al.* 1998, Mattagajasingh *et al.* 2000, D'Atri, Nadalutti, and Citi 2002). La formation d'un réseau de protéines jonctionnelles associé au cytosquelette d'actine permet la **mise en place et le maintien d'une barrière paracellulaire** impliquée dans la perméabilité membranaire (Tsukita *et al.* 2009, Ikenouchi *et al.* 2007). La fonction de barrière cellulaire implique également la notion de **polarité cellulaire** déterminée par des complexes protéiques tels que PAR (Par3-aPKC-Par6) et les protéines PATJ. Ikenouchi J *et al.* ont d'ailleurs montré l'importance de ZO-1 dans la formation d'une « ceinture » paracellulaire par les jonctions adhérentes et serrées pendant la polarisation épithéliale (Ikenouchi *et al.*

2007). Par ailleurs, lorsque ZO-3 interagit avec les protéines de polarité PATJ, la polarité cellulaire est maintenue par le recrutement des PATJ au niveau des jonctions serrées (Roh *et al.* 2002).

Il est donc indéniable que la formation de complexes protéiques jonctionnels, la fonction de barrière paracellulaire et de polarité cellulaire nécessitent l'implication des protéines ZO. La structure multi-complexe des ZO (PDZ/SH3/GK) permet donc la formation de complexes protéiques architecturaux mais également l'interaction avec des protéines intervenant dans des voies de signalisation cellulaire.

2.2. Rôle non-canonique des *zonula occludens*

Le rôle principal des ZO au niveau des **contacts cellule-cellule** est à l'origine de leur localisation cytoplasmique sub-membranaire ou juxta-membranaire. En revanche, les ZO sont des protéines comportant plusieurs séquences de localisation nucléaire (NLS) et des signaux d'export nucléaire (NES) qui leur permettent de « naviguer » entre le cytoplasme et le noyau des cellules. En effet, de nombreuses études *in vitro* sur des cellules épithéliales MDCK (*Madin-Barby Canine Kidney*) ont montré une variation de localisation des protéines ZO-1 et ZO-2 en fonction de la densité cellulaire (Islas *et al.* 2002). Les cellules confluentes placent les protéines ZO au niveau de la membrane pour renforcer les jonctions intercellulaires tandis que les cellules éparses favorisent la localisation nucléaire permettant d'agir sur des voies de signalisation (Gottardi *et al.* 1996, Islas *et al.* 2002, Bauer *et al.* 2010, Gonzalez-Mariscal *et al.* 2003). La double localisation des protéines ZO (sub-membranaire ou cyto-nucléaire) témoigne donc de leur dualité fonctionnelle, architecturale et/ou signalétique, dans la cellule.

Le **rôle signalétique** de ZO-1 a d'abord été mis en évidence par son interaction *via* son domaine SH3 avec le facteur de transcription ZONAB (*ZO-1 associated nucleic acid-binding protein*). La localisation de ZONAB dans les cellules épithéliales s'assimile et dépend de celle de ZO-1, en fonction de la densité cellulaire (Gonzalez-Mariscal, Tapia, and Chamorro 2008, Bauer *et al.* 2010). En effet, dans des cellules épithéliales éparses, ZONAB est majoritairement nucléaire et agit comme facteur de transcription capable de se lier aux régions promotrices de CD1 (*cyclin D1*) et PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), induisant ainsi la croissance et la prolifération cellulaire (Tapia *et al.* 2009, Sourisseau *et al.* 2006). De plus, ZONAB stimule

aussi la progression du cycle cellulaire de par son association avec la kinase CDK4 (*cyclin-dependant kinase-4*) qui, une fois accumulée dans le noyau, contrôle la transition G1/S (Balda, Garrett, and Matter 2003). Dans des cellules épithéliales confluentes, ZO-1 jonctionnel est surexprimé et séquestre ZONAB de façon inactive au niveau des jonctions, inhibant ainsi l'accumulation nucléaire de CDK4 en faveur du maintien des contacts intercellulaires (Balda and Matter 2000).

De la même façon, ZO-2 est **capable d'interagir** dans le noyau avec de nombreux facteurs régulateurs de la croissance et de la prolifération cellulaire. En effet, dans les cellules prolifératives éparses, ZO-2 est localisé dans le noyau et inhibe la prolifération cellulaire par blocage de la transition G1/S en diminuant l'expression transcriptionnelle de CD1 et en favorisant sa dégradation protéique par le protéasome (Tapia *et al.* 2009, Gonzalez-Mariscal *et al.* 2012). En revanche, lorsque les cellules sont en mitose, ZO-2 sort du noyau et va se localiser à la membrane dans les cellules épithéliales confluentes quiescentes (Tapia *et al.* 2009). De plus, ZO-2 régule le transport nucléaire de plusieurs protéines telles que le facteur d'ancrage SAF-B (*scaffold attachment factor-B*) (Traweger *et al.* 2003), le facteur d'épissage SC-35 (Islas *et al.* 2002) et les facteurs de transcription Jun, Fos et C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein*) (Betanzos *et al.* 2004). Ensemble, ZO-1 et ZO-2 interagissent avec la caténine ARVCF (*Armadillo repeat gene deleted in velo-cardio-facial syndrome*) au niveau des jonctions dans les cellules épithéliales confluentes et ZO-2 promeut sa localisation nucléaire lors de la rupture jonctionnelle des contacts cellule-cellule (Kausalya, Phua, and Hunziker 2004).

Bien que la localisation nucléaire de ZO-3 dans les cellules épithéliales ne soit toujours pas mise en évidence à ce jour, le domaine C-terminal de ZO-3 peut aussi interagir avec la caténine p120, permettant la régulation de l'adhérence et de la stabilisation des jonctions par des voies de signalisation Rho-dépendantes (Anastasiadis and Reynolds 2001).

De façon générale, la localisation nucléaire des protéines ZO est inversement corrélée au maintien et à la maturation des contacts cellule-cellule, et intervient dans la régulation de divers processus cellulaires tels que la prolifération cellulaire, la progression du cycle cellulaire ou encore la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes.

3. Les ZO dans la progression tumorale

L'homologie de séquence des ZO avec le gène suppresseur de tumeur *dlgA* (*disc large-1*) chez la drosophile a suggéré leur implication dans la progression tumorale. Il s'avère d'ailleurs que les protéines ZO sont les cibles de certaines onco-protéines virales. De plus, de nombreuses études ont mis en évidence la délocalisation et la régulation des protéines ZO dans différents cancers.

Des études effectuées durant les deux dernières décennies ont montré l'importance de la perturbation des jonctions intercellulaires dans le développement tumoral. Ces altérations peuvent notamment provenir d'une dérégulation des protéines ZO par des onco-protéines virales (Gonzalez-Mariscal, Lechuga, and Garay 2007). En effet, la protéine E6 du virus du papillome humain favorise la carcinogénèse en délocalisant la protéine jonctionnelle ZO-1, déstabilisant ainsi la structure des jonctions serrées et adhérentes dans les cellules épithéliales (Nakagawa and Huibregtse 2000). Par ailleurs, l'oncogène E1A des adénovirus humains augmente la perméabilité paracellulaire des cellules épithéliales en modifiant l'expression de ZO-1 au niveau de la barrière épithéliale (Fischer and Quinlan 1998). De plus, la protéine oncogénique codée par l'E4-ORF1 (*E4 open reading frame 1*) bloque la localisation membranaire de ZO-2 dans les cellules épithéliales MDCK et conduit à la désorganisation des jonctions serrées associée à une perte de polarité apico-basale (Latorre *et al.* 2005).

Le rôle des ZO dans la progression tumorale est différent en fonction du type de tumeur dans laquelle ils sont impliqués (Gonzalez-Mariscal, Lechuga, and Garay 2007) (**Tableau 9**). En effet, l'expression de ZO-1 est diminuée dans les cancers colorectaux (Kaihara, Kusaka, *et al.* 2003, Kaihara, Kawamata, *et al.* 2003, Mann *et al.* 1999), et les métastases du foie (Orban *et al.* 2008), ZO-1 et ZO-2 dans les cancers testiculaires (Fink *et al.* 2006), ZO-2 dans les cancers pancréatiques (Chlenski *et al.* 1999), ZO-2 et ZO-3 dans les cancers broncho-pulmonaires (Luczka *et al.* 2013, Paschoud *et al.* 2007) et les trois ZO dans les cancers mammaires (Bonnomet *et al.* 2012, Chlenski *et al.* 2000, Martin *et al.* 2004). En revanche, d'autres études ont montré que ZO-1 est augmenté dans les cancers du pancréas (Kleeff *et al.* 2001), de la thyroïde (Fluge *et al.* 2001) et dans les mélanomes (Smalley *et al.* 2005). Les protéines ZO sont donc impliquées dans différents processus tumoraux (mise en place, développement et

progression tumorale), à l'origine de nombreuses voies de signalisation (Gonzalez-Mariscal *et al.* 2014, Bauer *et al.* 2010).

	Type de cancer	Expression	Références
ZO-1	Sein	↙	Martin <i>et al.</i> (2004)
	Colorectal	↙	Kaihara <i>et al.</i> (2003a) ; Kaihara <i>et al.</i> (2003b)
	Mélanome	↗	Smalley <i>et al.</i> (2005)
	Pancréas	↗	Kleeff <i>et al.</i> (2001)
	Thyroïde	↗	Fluge <i>et al.</i> (2001)
	Testicule	↙	Fink <i>et al.</i> (2006)
	Foie	↙	Orban <i>et al.</i> (2008)
ZO-2	Poumon	↙	Luczka <i>et al.</i> (2013)
	Sein	↙	Chlenski <i>et al.</i> (2000)
	Pancréas	↙	Chlenski <i>et al.</i> (1999)
	Testicule	↙	Fink <i>et al.</i> (2006)
ZO-3	Poumon	↙	Paschoud <i>et al.</i> (2007)
	Sein	↙	Martin <i>et al.</i> (2004) ; Bonnomet <i>et al.</i> (2012)

Tableau 9 : Régulation des protéines ZO dans les carcinomes humains

Adapté d'après (Gonzalez-Mariscal, Lechuga, and Garay 2007)

Localisé du côté cytoplasmique de la membrane, ZO-1 agit plutôt comme un suppresseur de tumeur qui va séquestrer, à la membrane dans un état inactif, des facteurs nucléaires, intervenant dans la prolifération et la progression du cycle cellulaire. En revanche, la localisation cyto-nucléaire de ZO-1 favorise les processus de TEM et de progression tumorale (Gonzalez-Mariscal *et al.* 2016). En effet, dans des cellules épithéliales MDCK1, l'accessibilité des domaines PDZ de ZO-1 dans le cytoplasme induit une TEM à travers la voie de la caténine- β (Reichert, Muller, and Hunziker 2000). Dans les cancers mammaires, la translocation de ZO-1 dans le compartiment cyto-nucléaire favorise l'invasion des cellules cancéreuses par surexpression de la métalloprotéase MT1-MMP (*membrane type 1-matrix metalloproteinase*) (Polette *et al.* 2005, Polette *et al.* 2007). De plus, la colocalisation de ZO-1 avec la protéase ADAM12 (*disintegrin and metalloprotease-12*) dans les invadopodes de cellules invasives mammaires favorise la dégradation de la matrice extracellulaire (Dekky *et al.* 2018). Par ailleurs, nous avons récemment montré une corrélation entre l'expression nucléaire de ZO-1 et l'augmentation de la vascularisation dans les tumeurs broncho-pulmonaires (Lesage *et al.*

2017). De plus, nous avons démontré que ZO-1 régule l'expression de cytokines pro-inflammatoires, comme l'Interleukine-8 (IL-8), lorsqu'il est délocalisé vers le noyau (Bryse *et al.* 2012) et ceci *via* une interaction avec la voie NF-kB (Lesage *et al.* 2017).

Contrairement à ZO-1, ZO-2 est diminuée dans les cancers et agit davantage comme un suppresseur de tumeur. En effet, ses interactions avec les suppresseurs de tumeurs hScribble (Metais *et al.* 2005) et SAF-B (Oesterreich *et al.* 2001) en témoignent (**Figure 12**). De plus, l'inhibition transitoire de ZO-2 augmente les propriétés invasives et migratoires des cellules cancéreuses pulmonaires en surexprimant la MT1-MMP (Luczka *et al.* 2013). Par ailleurs, ZO-2 est capable de bloquer la voie de signalisation Wnt en réprimant l'activité transcriptionnelle des gènes contrôlés par les sites de liaison TCF/LEF (Tapia *et al.* 2009). Il exerce également un rôle dans l'apoptose en se complexant avec la protéine pro-apoptotique YAP (*Yes kinase-associated protein 2*) (Oka and Sudol 2009).

Concernant ZO-3, une diminution de son expression a été mise en évidence dans des cellules mammaires induites en TEM (Mikaelian *et al.* 2013) tandis qu'une augmentation de l'expression transcriptionnelle de l'ARNm de ZO-3 a été révélée dans des tissus de carcinomes de l'endomètre (Colas *et al.* 2011).

L'ensemble de ces résultats témoigne de la complexité de régulation des protéines ZO dans les différents cancers associés à plusieurs mécanismes de signalisation. Généralement une faible expression des protéines ZO corrèle avec le développement de tumeurs, la présence de métastases et un mauvais pronostic dans de nombreux cancers. Cependant la diminution d'expression des ZO est bien souvent associée à une délocalisation des protéines jonctionnelles ZO de la membrane vers le cytoplasme et le noyau, dans les cellules tumorales invasives. Ces changements de localisation favorisent la régulation de nombreux gènes intrinsèques de la cellule mais peuvent également agir sur les propriétés d'interaction avec les cellules du microenvironnement tumoral.

PARTIE IV

Inflammation et immunité tumorale

IV. Inflammation et immunité tumorale

1. Immunité tumorale

La notion de reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire a été démontrée en 1992, suite à une expérimentation de coculture *in vitro* de cellules issues de biopsie de tumeur primaire avec des lymphocytes. En effet, l'équipe de Boon de l'Institut Ludwig à Bruxelles a mis en évidence la présence d'**antigènes tumoraux** à la surface des cellules tumorales, initiateurs de la prolifération et de l'activation de la réponse lymphocytaire (Boon, Coulie, and Van den Eynde 1997). La réponse immunitaire, basée sur la discrimination des cellules du « soi » et du « non-soi », est un mécanisme de défense de l'organisme face aux cellules tumorales. Deux types de réponses immunitaires existent : d'une part, l'immunité innée immédiate et d'autre part l'immunité adaptative tardive. Ces réponses font intervenir les cellules du système immunitaire, dites « **immunocompétentes** », issues des lignées myéloïdes (polynucléaires, macrophages, cellules dendritiques) ou lymphoïdes (lymphocytes) et provenant d'un précurseur commun, la cellule souche hématopoïétique (CSH) (Charles A Janeway *et al.* 2001) (**Figure 13**).

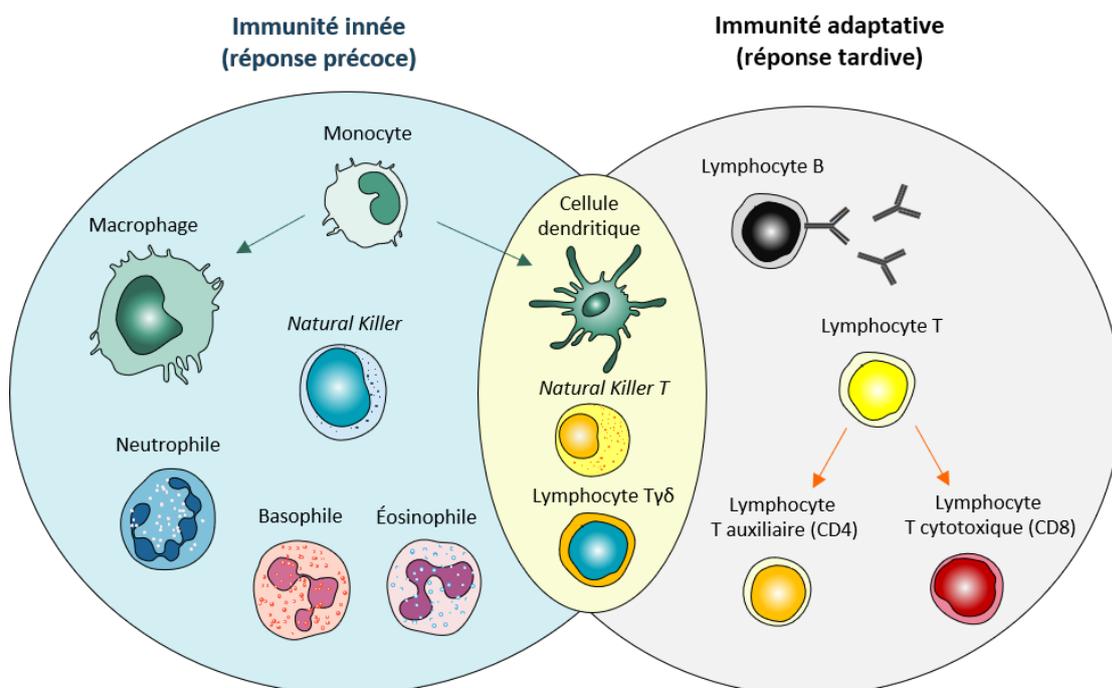


Figure 13 : Les cellules de l'immunité innée et acquise

1.1. Immunité innée

1.1.1. Réponse immunitaire naturelle

La réponse immunitaire innée ou naturelle est immédiatement mise en place et constitue la première ligne de défense face aux cellules tumorales. Cette immunité est instantanée et dure jusqu'à 4 jours. Elle est induite *via* l'émission de molécules DAMP (*Danger Associated Molecular Pattern*) par les cellules cancéreuses qui, reconnues par les récepteurs PRR (*Pattern Recognition Receptors*) exprimés à la surface des cellules immunitaires résidentes, sont à l'origine de « signaux de dangers » pour l'organisme (Land 2015). De façon induite, des cellules phagocytaires mono-/polynucléées (granulocytes polynucléaires, monocytes/macrophages) et des cellules NK dites « tueuses naturelles » sont recrutées dans le but d'éliminer les cellules étrangères par des phénomènes de phagocytose et de lyse cellulaire, respectivement (Blach-Olszewska 2005, Gasteiger *et al.* 2017). Rapidement, une réponse inflammatoire précoce se met en place, favorisant la phase vasculaire et le recrutement de cellules immunitaires au site d'inflammation (Gasteiger *et al.* 2017, Land 2015). Cette réponse immunitaire fait également appel aux cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques, macrophages), responsables de l'induction de la réponse adaptative spécifique.

1.1.2. Cellules de l'immunité innée

1.1.2.1. Phagocytes mononucléés ou mononucléaires

Les **cellules monocytaires** sont des cellules immatures produites par la moelle osseuse. Les monocytes sont capables de migrer, *via* la circulation sanguine, jusqu'à un tissu cible, dans lequel ils pourront ensuite se différencier soit en macrophages, soit en cellules dendritiques. Phénotypiquement, les monocytes humains sont identifiés par l'expression du cluster de différenciation CD14 (Mittar, Paramban, and McIntyre 2011).

Les **macrophages**, qualifiés de **cellules phagocytaires par excellence**, sont littéralement les « éboueurs » de l'organisme. En effet, ils ont pour fonction principale de nettoyer, de phagocyter, d'éliminer l'ensemble des débris cellulaires présents au sein de l'organisme comme les corps apoptotiques et les déchets de nécrose cellulaire (Richards, Hettinger, and Feuerer 2013, Mombelli 2014) (**Tableau 10**). La présence ubiquitaire des macrophages dans l'organisme a donné naissance à plusieurs noms de macrophages en fonction de leur tissu

résidant ; par exemple, les macrophages alvéolaires et interstitiels du poumon, les cellules de Küpfer du foie ou encore les microglies du cerveau. De façon générale, les macrophages humains sont caractérisés par le marqueur CD68 (Mittar, Paramban, and McIntyre 2011) (**Tableau 10**). Il existe une **polarisation macrophagique**, à l'origine d'une différenciation en deux types de macrophages différents, phénotypiquement et fonctionnellement (Isidro and Appleyard 2016). Les **macrophages de type M1**, exprimant le récepteur CCR7 à leur surface, produisent des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-12...) et activent les lymphocytes Th1, favorables à la destruction des cellules tumorales (Osinska *et al.* 2016, Raggi *et al.* 2017). Les **macrophages de type M2**, quant-à eux, expriment le cluster de différenciation CD169 et sécrètent des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β) en faveur du développement tumoral (Osinska *et al.* 2016, Raggi *et al.* 2017, Pollard 2004). De plus, les cellules macrophagiques ont la particularité de participer à la réponse immunitaire adaptative en jouant le rôle de cellules présentatrices d'antigènes (section Intro - IV.1.1.2.4).

Le rôle des monocytes et des macrophages dans la progression tumorale est aujourd'hui reconnu. En effet, une étude sur un modèle *in vivo* d'adénocarcinome pulmonaire induit par la mutation de l'oncogène K-RAS a révélé une altération de la différenciation des monocytes de la lignée myéloïde en cellules immunosuppressives MDSC (*myeloid-derived suppressor cells*) (section Intro - IV.2.2) (Cortez-Retamozo *et al.* 2012). De plus, nous avons contribué à montrer que MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) est induite durant les programmes de TEM *via* la voie de la caténine- β (Mestdagt *et al.* 2006). Par ailleurs, les cellules tumorales elles-mêmes produisent et sécrètent des chimiokines responsables du recrutement de macrophages associés à la tumeur (TAM ; *Tumor-associated macrophage*), localisés au sein de la tumeur elle-même (Pollard 2004). Une étude de 2002 a d'ailleurs mis en évidence une corrélation entre le recrutement élevé de TAM et un mauvais pronostic dans les cancers du sein, de la prostate et de l'ovaire (Bingle, Brown, and Lewis 2002). En revanche, cette corrélation est controversée dans certains cancers, notamment les CBNPC, dont la présence élevée de TAM corrèle avec une régression de la croissance tumorale (Bingle, Brown, and Lewis 2002). En effet, même si les macrophages M1 sont associés à un rôle anti-tumoral majoritaire, l'élimination des cellules tumorales par les M1 est à l'origine de la production de ROS, radicaux oxygénés toxiques pour l'organisme. A l'inverse, le rôle pro-tumoral des

macrophages M2 favorise l'angiogenèse, la croissance tumorale et le développement de métastases (Lamagna, Aurrand-Lions, and Imhof 2006).

1.1.2.2. Granulocytes polynucléés ou polynucléaires

Les **granulocytes polynucléaires** proviennent de la moelle osseuse et doivent leur nom à la forme particulière adoptée par leurs noyaux polylobés. Il existe trois types de granulocytes polynucléaires qui diffèrent selon leur propriété cytoplasmique et leur fonction : les polynucléaires neutrophiles qui nous intéressent plus particulièrement, les polynucléaires basophiles impliqués dans les phénomènes d'allergies et les polynucléaires éosinophiles.

La population la plus représentée est celle des **polynucléaires neutrophiles**. Ce sont des cellules phagocytaires activées et recrutées par diverses chimiokines, généralement produites par les cellules locales et les macrophages. Ces granulocytes sont donc capables d'englober et de dégrader les cellules tumorales (Kolaczowska and Kubes 2013, Rosales *et al.* 2016). Les granulations azurophiles⁶ des neutrophiles contiennent également des substances destructrices efficaces, telles que **l'élastase des neutrophiles (NE)** et la **myéloperoxydase (MPO)**. Suite à l'activation des polynucléaires neutrophiles, ces granules participent à la libération de réseaux de fibres d'ADN et d'histones extracellulaires, qualifiés de **NET** (*neutrophil extracellular traps*). Ces « filets du neutrophile » sont capables de dégrader les facteurs de virulence des pathogènes (Gougerot-Pocidallo *et al.* 2007, Papayannopoulos *et al.* 2010) (**Tableau 10**). Contrairement aux macrophages, les neutrophiles qui participent à la phagocytose, ont une durée de vie très limitée (Iba *et al.* 2013).

Dans le développement tumoral précoce, les neutrophiles jouent un rôle anti-tumoral en stimulant la réponse immune adaptative par activation des lymphocytes T et la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-8, IL-6, TNF- α ...) (Fridlender *et al.* 2009). Les travaux de Fridlender *et al.* ont d'ailleurs démontré l'importance des neutrophiles dans l'inhibition tumorale par un modèle *in vivo* murin déplété en neutrophile qui entraîne une croissance tumorale accrue par rapport aux contrôles (Fridlender *et al.* 2009). Cependant, malgré la nature chronique du cancer et la faible durée de vie des neutrophiles, certaines études évoquent le pouvoir pro-tumoral des neutrophiles dans les tumeurs (Nicolás-Ávila, Adrover, and Hidalgo 2017). En effet, tout comme les TAM, il existe également des **neutrophiles**

⁶ **Granulation azurophile** : granules caractéristiques des granulocytes, colorables par l'éosinate d'azur

associés aux tumeurs, appelés TAN (*Tumor-associated neutrophils*). Une étude clinique sur 4000 patients atteints de différents types de cancers, notamment des carcinomes hépatocellulaires, rénaux et pancréatiques, a d'ailleurs révélé une corrélation entre une forte densité de TAN intra-tumorale et une faible survie globale de ces patients (Shen *et al.* 2014). De plus, la production de NE par les neutrophiles inhibe la prolifération des cellules tumorales mais aussi la croissance et l'angiogenèse tumorale à travers la voie PI3K (Deryugina *et al.* 2014, Galdiero *et al.* 2018).

1.1.2.3. Lymphocytes « *natural killer* » (NK)

Les cellules « *natural killer* », comme leur nom l'indique, ont une fonction de « **cellules tueuses** ». En effet, ces cellules lymphoïdes, qui ne correspondent ni à un lymphocyte B, ni à un lymphocyte T, ont la capacité d'éliminer les cellules du « non-soi ». C'est par l'expression de la molécule de classe 1 du **complexe majeur d'histocompatibilité (CMH-I)** que la cellule NK fait la différence entre les cellules saines du « soi » qui l'expriment et les cellules altérées cancéreuses du « non-soi », qui ne l'expriment pas. Pour ce faire, les « *natural killer* » possèdent à leur surface deux types de récepteurs majeurs : des récepteurs activateurs, qui reconnaissent un ligand spécifique à la surface de toutes les cellules, à l'origine d'un signal « tueur », et des récepteurs inhibiteurs KIR (*Killer-cell immunoglobulin-like receptors*) qui reconnaissent le CMH-I à la surface des cellules saines, inactivant ainsi le signal d'élimination cellulaire (Caligiuri 2008). Une fois activée, les cellules NK, qui appartiennent à la famille des **grands lymphocytes granuleux**, sécrètent des granules lytiques et des cytokines pro-inflammatoires nécessaires à l'élimination des cellules tumorales. Par ailleurs, elles sont également capables d'interagir avec d'autres cellules du système inné pour augmenter l'efficacité de la réponse adaptative (Vivier *et al.* 2008). Phénotypiquement, les cellules NK sont caractérisées par l'expression du cluster de différenciation CD56 (Poli *et al.* 2009) (**Tableau 10**).

Dans les cancers, l'activation des cellules NK permet de limiter la croissance tumorale et le développement des métastases par élimination des cellules tumorales étrangères et par la libération de chimiokines chémo-attractantes des cellules inflammatoires telles que les granulocytes, les monocytes ou encore les cellules dendritiques (Wu and Lanier 2003). Dans ce sens, des études récentes évaluent même la possibilité d'utiliser les cellules NK comme

modèle d'immunothérapie potentiel. En effet, plusieurs méthodes sont mises à l'étude pour optimiser l'efficacité de ces « cellules tueuses » vis-à-vis des cellules tumorales : en passant par l'inhibition des mécanismes immunosuppresseurs des cellules NK, à la prolifération poussée des cellules NK et/ou l'amélioration du système de reconnaissance utilisé par les « *natural killer* » (Lowry and Zehring 2017, Guilleroy, Huntington, and Smyth 2016, Fang, Xiao, and Tian 2017). A ce jour, l'utilisation individuelle de cellules NK immuno-thérapeutiques ou en combinaison avec d'autres thérapies reste sujet à discussion mais les résultats prometteurs de ces recherches ne sont pas ignorés.

1.1.2.4. Cellules dendritiques

La découverte des cellules dendritiques par Langherhans date de plus d'un siècle, en 1868. Cependant, la fonction de ces cellules à expansions cytoplasmiques appelées dendrites n'a été connue qu'en 1973 par Ralph Steinman. Faisant l'objet du prix nobel de médecine en 2011, il est le premier à qualifier ces cellules, ubiquitaires dans l'organisme, de **cellules présentatrices d'antigène (CPA)** (Steinman and Cohn 1973). En effet, ces **cellules phagocytaires** immatures sont capables de capturer et de phagocyter les antigènes tumoraux. Une fois activées, ces cellules exposent alors les antigènes tumoraux à leur surface membranaire et les transportent au niveau des organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques...) pour les présenter aux lymphocytes et ainsi **activer la réponse immunitaire spécifique**. Phénotypiquement, les cellules dendritiques murines et humaines, peuvent être identifiées par le cluster de différenciation CD11c (Osugi, Vuckovic, and Hart 2002) (**Tableau 10**).

Bien que la présence de cellules dendritiques dans le microenvironnement tumoral semble associée à une immunosurveillance dans les cancers, certaines cellules dendritiques associées au cancer sont capables d'activer les cellules immunosuppressives Tregs et de favoriser la progression tumorale (Tesone *et al.* 2016). En effet, des études ont d'ailleurs corrélé le recrutement de cellules dendritiques dans de nombreux cancers, notamment mammaires et mélanomes, à un mauvais pronostic (Saadeh, Kurban, and Abbas 2016, Lombardi, Khaiboullina, and Rizvanov 2015).

1.2. Immunité acquise

1.2.1. Réponse immunitaire spécifique

Contrairement à l'immunité immédiate, la réponse immunitaire adaptative ou spécifique se développe en seconde ligne de défense c'est-à-dire en cas d'inefficacité des cellules de l'immunité innée. De ce fait, elle se met en place au bout de quatre jours et fait suite à l'immunité naturelle de façon beaucoup plus prolongée. Elle fait intervenir les cellules issues de la lignée lymphoïde : les lymphocytes B, responsables de la **réponse à médiation humorale**, les lymphocytes T, responsables de la **réponse à médiation cellulaire** et les cellules « tueuses lymphocytaires » NKT (*natural killer T*), qui agissent en parallèle. D'un point de vue mécanistique, ces lymphocytes reconnaissent les antigènes tumoraux spécifiques par l'intermédiaire de deux types de récepteurs : les récepteurs BcR, exprimés à la surface des lymphocytes B et les récepteurs TcR, exprimés à la surface des lymphocytes T. Les lymphocytes T et NKT nous intéressent plus particulièrement et seront donc développés plus amplement.

1.2.2. Cellules de l'immunité acquise

1.2.2.1. Lymphocytes T

Les lymphocytes T tiennent leur nom de leur lieu de maturation, le **thymus** d'où la lettre « T ». Les lymphocytes T sont responsables de la **réponse à médiation cellulaire**, par l'intervention de cellules T effectrices cytotoxiques visant à éliminer les cellules tumorales. Ce sont les cellules présentatrices d'antigènes (cellule dendritique, macrophage et lymphocyte B) qui sont à l'origine de l'activation des lymphocytes T naïfs. En effet, les CPA expriment à leur surface des molécules du CMH de type 2 ; en plus du CMH de type 1 des cellules du « soi » ; reconnues par les lymphocytes T. Une fois activées, les cellules T naïves vont se différencier en deux types de **cellules T effectrices** : les lymphocytes T auxiliaires caractérisés par l'expression du CD4 (T helper CD4+) et les lymphocytes T cytotoxiques caractérisés par l'expression du CD8 (CTL CD8+) (Aniansson Zdolsek *et al.* 1999). Phénotypiquement, les lymphocytes T expriment leur récepteur caractéristique **TcR** (*T-cell receptor*) constitué de chaînes α et β et sont caractérisés par l'expression du cluster de différenciation CD3 (**Tableau 10**).

Les **lymphocytes T auxiliaires CD4+**, comme leur nom l'indique, régulent la réponse immune spécifique en « aidant » les autres cellules effectrices à réaliser leur fonction par des signaux d'activation. Par exemple, une fois la reconnaissance de l'antigène tumoral par le TcR présenté par les CPA *via* leur CMH-II, les lymphocytes T auxiliaires vont sécréter des cytokines capables d'activer la cytotoxicité des cellules CD8+. Les lymphocytes T auxiliaires peuvent être subdivisés en deux sous-populations opposées en fonction de leurs sécrétions cytokiniques. En effet, **les lymphocytes Th1** produisent des cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- α et l'IL-2, activent les lymphocytes T naïfs et la cytotoxicité des cellules CD8+ par sécrétion de l'IFN- γ et inhibent la réponse Th2. En opposition, les **lymphocytes Th2** produisent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4 et l'IL-10 et inhibent la réponse INF- γ dépendante des Th1 (Zhu and Paul 2008, Mombelli 2014). De façon générale, les lymphocytes Th1 sont plutôt associés à un pronostic favorable dans certains cancers, tandis que les lymphocytes Th2 favorisent la prolifération des cellules tumorales à défaut du système immunitaire (Kidd 2003). De plus, les lymphocytes T auxiliaires peuvent également se différencier en **lymphocytes Th17**. Une fois activés, ces lymphocytes sécrètent, comme leur nom l'indique, majoritairement de l'IL-17A mais aussi du TNF- α et de l'IL-6. Ainsi, les cellules Th17 possèdent des propriétés pro-inflammatoires importantes, souvent indicatrices de mauvais pronostic dans les cancers (Cochaud *et al.* 2013).

Les **lymphocytes T CD8+ naïfs**, activés indirectement par les CPA, prolifèrent et se différencient en **cellules T cytotoxiques (CTL)**. Les CTL migrent vers la tumeur dans le but d'éliminer les cellules tumorales par sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, par libération de protéines lytiques telles que la perforine et la granzyme, mais également par l'émission de signaux pro-apoptotiques *via* l'expression du récepteur R-Fas.

Les **lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL)** sont sujets à controverse dans de nombreuses études. En effet, si l'étude de Thompson *et al.* montre une infiltration significativement plus importante de lymphocytes T CD8+ dans les adénocarcinomes gastriques (Thompson *et al.* 2017), les travaux de Chae *et al.* révèlent une corrélation inverse entre l'infiltration des cellules T CD4+ et CD8+ avec les protéines marqueurs de TEM chez les patients CBNPC (Chae *et al.* 2018). Par ailleurs, si l'infiltration importante de cellules T effectrices au sein de la tumeur semble de bon pronostic, des études ont montré l'inactivation de ces cellules par les cellules tumorales *via* des mécanismes immunosuppresseurs (Thompson *et al.* 2017, Ostrand-

Rosenberg, Horn, and Haile 2014, Simon and Labarriere 2018). En effet, le ligand PD-L1 exprimé par les cellules tumorales, inactive la réponse immunitaire T, en se liant à son récepteur spécifique PD-1, exprimé à la surface des cellules T (section Intro - I.4.2.3) (Ostrand-Rosenberg, Horn, and Haile 2014).

1.2.2.2. Lymphocytes NKT

Le lymphocyte « *Natural Killer* » T est une cellule intermédiaire entre le lymphocyte T et la cellule NK qui peut intervenir lors de l'immunité adaptative mais également innée. En effet, la cellule NKT possède les mêmes propriétés que la cellule « tueuse » NK mais exprime à sa surface le récepteur TcR des cellules T et les clusters de différenciation CD3 et CD56 (Koreck *et al.* 2002). Sa maturation est également effective dans le thymus et son activation est dépendante des CPA. En effet, une fois activée par la reconnaissance des antigènes tumoraux présentés par les CPA, la cellule NKT sécrète des cytokines nécessaires à l'activation des cellules du système immunitaire comme l'IL-4 par exemple. En effet, l'IL-4 est responsable de la différenciation et de l'activation des CD4 naïfs en cellules Th2 (May, Jinushi, and Dranoff 2013, Mak and Saunders 2006).

Comme la majorité des cellules immunitaires, les cellules NKT jouent des rôles opposés vis-à-vis de la tumeur. En effet, les **cellules NKT de type I** produisent principalement de l'IFN- γ , cytokine activatrice des cellules NK et LT CD8+ mais aussi de l'IL-12, interleukine stimulatrice de l'activité des cellules dendritiques. En contradiction, les **cellules NKT de type II** sont capables d'inhiber l'immunité tumorale en favorisant l'immunosuppression (Terabe and Berzofsky 2008, Nair and Dhodapkar 2017).

1.2.2.3. Lymphocytes T $\gamma\delta$

Les **lymphocytes T $\gamma\delta$** sont qualifiés de lymphocytes non conventionnels car ils expriment à leur surface le récepteur de reconnaissance des antigènes **TcR** constitué, comme leur nom l'indique, de **chaînes γ et δ** . Produits dans le thymus et exprimant rarement les co-récepteurs CD4 et CD8, ces lymphocytes s'activent sans nécessité de présentation d'antigène par le CMH. En effet, ils sont capables de s'activer par reconnaissance d'une grande diversité d'antigène et notamment la sous-population T V γ 9V δ 2, connue pour la reconnaissance de petites molécules non peptidiques appelées **phosphoantigènes (PAg)**. Après stimulation, les T $\gamma\delta$ produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et le TNF- α , sécrètent des

granules lytiques telles que les perforines et les granzymes, et expriment des récepteurs activateurs de lyse, similaires à ceux des *Natural Killer* (Bonnevillie and Scotet 2006).

Par leurs propriétés cytotoxiques, les lymphocytes $T\gamma\delta$ jouent donc un rôle important dans l'immunité anti-tumorale. Des études montrent d'ailleurs leur utilisation en thérapie anticancéreuse (Catros *et al.* 2010). En effet, l'utilisation d'un agoniste synthétique des lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$, le Phosphostim™, entraîne une lyse importante de cellules tumorales isolées de patients atteints de carcinome rénal (Viey *et al.* 2005). Cependant, dans certains cancers, l'efficacité anti-tumorale des $T\gamma\delta$ peut aussi être inhibée par les cellules immunosuppressives Foxp3+ (Catros *et al.* 2010).

Ainsi, les **rôles paradoxaux de l'ensemble des cellules inflammatoires** et immunitaires dans le microenvironnement tumoral, affaiblissent le système immunitaire anti-tumoral et engendrent l'échappement du cancer, favorable à la progression tumorale.

2. Échappement tumoral

2.1. Microenvironnement immunitaire pro-tumoral

Une tumeur est un élément hétérogène complexe qui interagit avec l'ensemble des cellules et des molécules présentes dans son environnement proche. Son développement n'est donc pas seulement défini par la simple prolifération des cellules tumorales, mais également par un microenvironnement tumoral établi comme un « réseau » autour de la tumeur. Les cellules de l'hôte constituant le microenvironnement tumoral sont essentiellement des cellules endothéliales impliquées dans l'angiogenèse ou la lymphangiogenèse, des cellules inflammatoires (TAM, TIL et TAN) et des fibroblastes associés au cancer (CAFs) (Joyce and Pollard 2009, Le Bitoux and Stamenkovic 2008). Même si certaines cellules inflammatoires sont impliquées dans la réponse immunitaire anti-tumorale, beaucoup d'entre-elles favorisent la progression tumorale. Il est également intéressant de noter que certaines cellules inflammatoires, notamment les TAM et les TAN peuvent collaborer avec les cellules tumorales pour faciliter l'interaction avec les vaisseaux sanguins et l'intravasation (Pollard 2004, Gregory and Houghton 2011). Ainsi, les cellules inflammatoires et immunitaires tumorales participent à l'élimination de la tumeur, mais contribuent également à son développement en cas d'échappement tumoral (Mombelli 2014) (**Figure 14**).

Type Cellulaire	Monocyte	Macrophage (Mφ)	Granulocytes polynucléaires			Cellule dendritique (DC)	Natural Killer (NK)	Lymphocytes		
			Neutrophile	Eosinophile	Basophile			LB	L Th (CD4+)	CTL (CD8+)
Localisation	Sang, Tissu	Tissu	Sang, Tissu	Tissu, Organes lymphoïdes secondaires	Sang, Tissu	Sang, Organes lymphoïdes secondaires				
Lignée			Myéloïde				Lymphoïde			
Marqueurs	CD14+	CD68+	NE+/MPO+	CD11c+	CD56+	CD20+	CD3+, CD4+	CD3+, CD8+		
Proportion	4 à 8%	4 à 8%	40-70%	Variable	Variable		24%			
Taille	12 à 15 μm	30 à 60 μm	12 à 14 μm	Variable	Variable		7 à 9 μm			
Fonctions principales	Phagocyte Se différencie en Mφ ou DC	Phagocyte CPA	Sécrétion de médiateurs de l'inflammation chronique	Cellule sentinelle	Cellule sentinelle tueuse	Se différencie en plasmocyte (Ac) Réponse humorale	Cellule auxiliaire Réponse cellulaire	Cellule cytotoxique		
Phénotype	Granule -, cytoplasme important 	Grosse cellule, cytoplasme important 	Granules ++, noyau polylobé 	Granules ++, noyau polylobé 	Granules ++, noyau polylobé 	Noyau important, enzymes 	Gros noyau, cytoplasme restreint 	Gros noyau, cytoplasme restreint 		

Tableau 10 : Caractéristiques majeures des cellules de l'immunité

Abréviations : Mφ : macrophage ; DC : cellule dendritique ; NK : natural killer ; LB : lymphocyte B ; LTh : lymphocyte T helper ; CTL : lymphocyte T cytotoxique ; NE : élastase du neutrophile ; MPO : myéloperoxydase

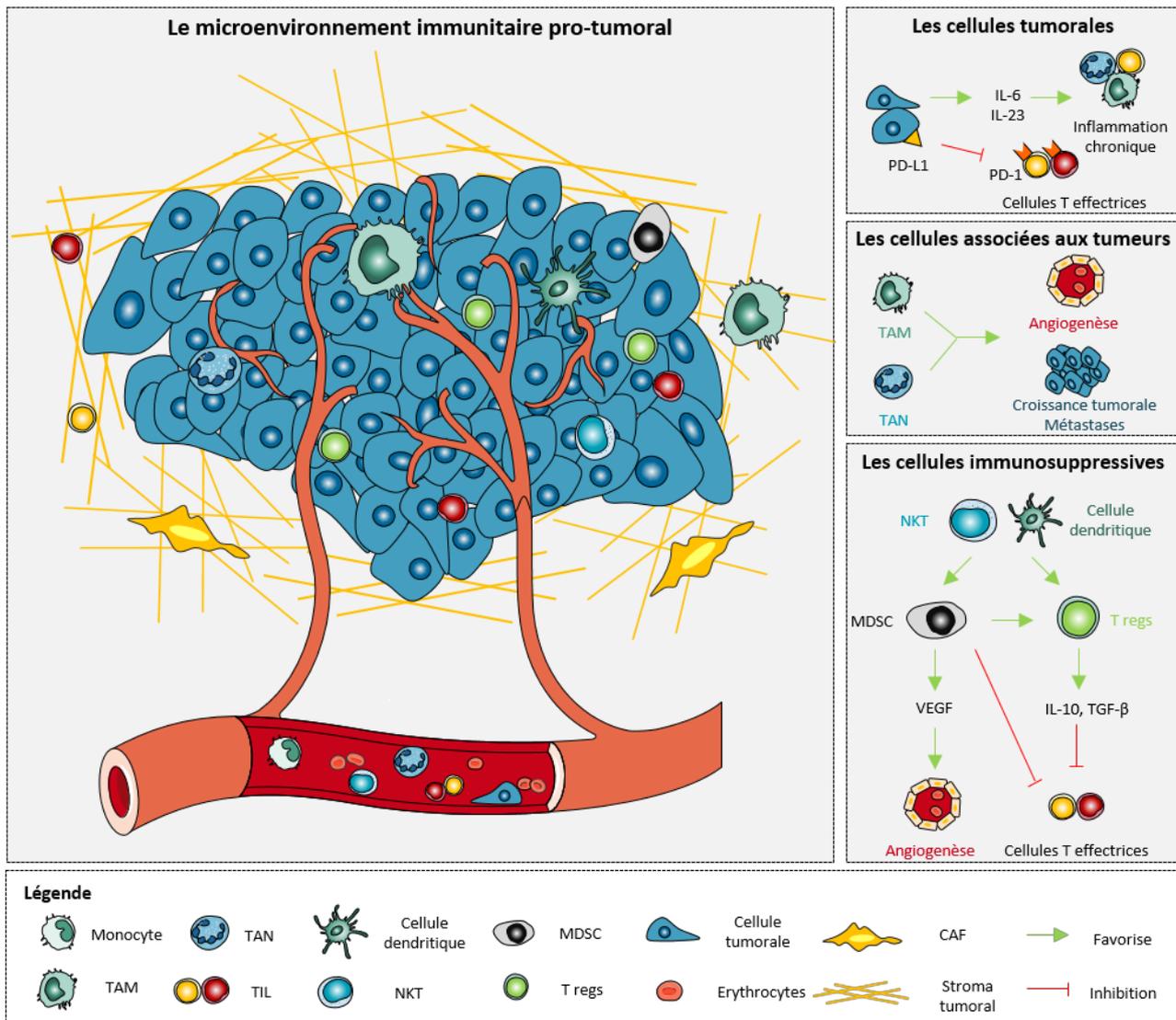


Figure 14 : Le microenvironnement immunitaire pro-tumoral

Abréviations : TAM : macrophage associé aux tumeurs ; TAN : neutrophile associé aux tumeurs ; TIL : lymphocyte associé aux tumeurs ; DC : cellule dendritique ; NKT : natural killer T ; MDSC : cellule myéloïde suppressive ; Treg : cellule T régulatrice

Dans un premier temps, l'immunologie des tumeurs est basée sur la suppression des cellules tumorales par les cellules du système immunitaire au cours de l'**immunosurveillance**. Cependant, certaines cellules tumorales parviennent parfois à échapper au système immunitaire. S'en suit alors, une **phase d'équilibre** entre les cellules de l'immunité anti-tumorale et le microenvironnement pro-tumoral. En effet les cellules immunitaires contrôlent la prolifération **tumorale en dormance**, qui continue malgré tout à se multiplier lentement (Vesely and Schreiber 2013). Au cours de cette étape, qui peut durer plusieurs années, les

cellules tumorales acquièrent petit à petit des changements caractéristiques immunologiques qui leurs permettent par la suite d'échapper à la surveillance immunitaire ; on parle alors d'**échappement tumoral**. Non seulement la tumeur prolifère rapidement, mais en plus, l'inflammation chronique créée par les défenses immunitaires constitutivement activées accentue l'établissement d'un **microenvironnement pro-tumoral**, favorable à son développement. En effet, l'expression continue de cytokines régulatrices pro-inflammatoires telles que l'IL-6 associée à un environnement inflammatoire chronique devenu néfaste, permet de recruter des cellules immunosuppressives impliquées dans la régulation des cellules immunitaires en faveur de la prolifération et de l'invasion des cellules tumorales (Kanterman, Sade-Feldman, and Baniyash 2012).

2.2. Recrutement des cellules immunosuppressives

2.2.1. Cellules T régulatrices (Treg)

Les cellules T régulatrices ou « Tregs » proviennent de la différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs. En effet, suite à la stimulation du récepteur TcR associé à l'expression du facteur de croissance TGF- β , les LT CD4 expriment le facteur de transcription Foxp3 (*forkhead box p3*), caractéristique de la différenciation en cellules T régulatrices (Hori, Nomura, and Sakaguchi 2003). D'un point de vue mécanistique, les cellules Tregs exercent leur rôle de cellules immunosuppressives par plusieurs mécanismes : sécrétion de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 et le TGF- β ; l'inhibition de la prolifération des cellules T effectrices de l'immunité adaptative ; l'altération des cellules présentatrices d'antigènes tumoraux (Siri, Boysson, and Boursier 2012) (**Figure 14**).

Les Tregs sont donc des acteurs clés de la croissance et de la progression tumorale à travers l'inhibition des cellules effectrices du système immunitaire (Wei, Kryczek, and Zou 2006). En effet, cette population Foxp3⁺ est anormalement élevée dans de nombreux cancers notamment dans le mélanome et différents carcinomes et est associée à un mauvais pronostic. Des expériences *in vivo* ont d'ailleurs démontré la restauration d'une activité anti-tumorale efficace suite à l'élimination de Tregs (Maury *et al.* 2010).

2.2.2. Cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC)

Les cellules myéloïdes immunosuppressives MDSC (*myeloid derived suppressor cells*) sont des cellules immatures générées à partir des progéniteurs myéloïdes, en défaveur des cellules myéloïdes normales. En effet, en condition physiologique, les progéniteurs myéloïdes se différencient en granulocytes, macrophages ou en cellules dendritiques. En revanche, dans un contexte tumoral, la libération de cytokines et facteurs solubles tels que GM-CSF, G-CSF ou encore M-CSF par les cellules tumorales, bloque la différenciation des cellules myéloïdes normales et favorise l'accumulation des cellules MDSC (Gabrilovich and Nagaraj 2009). Ces cellules immunosuppressives, caractérisées par l'expression du cluster de différenciation CD11b, sont capables d'altérer la prolifération et la survie des cellules T effectrices et d'activer les cellules Tregs (Yang *et al.* 2008) (**Figure 14**).

Dans le microenvironnement tumoral, les cellules MDSC produisent des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF, qui favorisent la croissance tumorale, l'angiogenèse et la lymphangiogenèse (Gabrilovich and Nagaraj 2009). Elles participent également à la mise en place d'une niche-métastatique en induisant une angiogenèse locale et la survie des cellules tumorales métastatiques. Parfois, certaines cellules MDSC accentuent l'hétérogénéité tumorale en se différenciant en TAM (Sinha *et al.* 2007).

2.2.3. Autres régulateurs

L'immunosuppression est une étape clé de l'immunité tumorale et dépend en partie des cellules immunosuppressives telles que les cellules Tregs, les cellules MDSC mais également les cellules immunitaires associées aux tumeurs telles que les TAM, les TIL et les TAN, arborant des propriétés pro-tumorales (Joyce and Pollard 2009). Les cellules tumorales sont également capables d'inhiber la réponse immune T en exprimant le ligand membranaire PD-L1 à leur surface. En effet, ce ligand est spécifique du récepteur PD-1 exprimé à la surface des cellules T et transduit un signal immunosuppressif à travers cette interaction PD-L1/PD-1 (Antonia *et al.* 2016, Sacher and Gandhi 2016) (section Intro - 1.4.2.3) (**Figure 14**). L'ensemble des cellules tumorales et immunitaires sont responsables de la production de diverses cytokines immunorégulatrices et pro-inflammatoires. En effet, le TGF- β et l'IL-10 sont impliqués dans l'activation des cellules Tregs (Siri, Boysson, and Boursier 2012) tandis que l'IL-6 et l'IL-23

contribuent au maintien d'une inflammation chronique carcinogène (Kanterman, Sadel-Feldman, and Baniyash 2012) (**Figure 14**).

La sécrétion de certaines cytokines et chimiokines au sein du microenvironnement tumoral favorise le recrutement d'un stroma immunitaire pro-tumoral et l'accumulation de cellules immunosuppressives en périphérie et au sein de la tumeur.

3. Molécules de l'immunité : focus sur les chimiokines

3.1. Superfamille des chimiokines

3.1.1. Rôles des chimiokines

Les chimiokines sont de petites protéines de 8 à 14 kDa, découvertes dans les années 1990, qui appartiennent à la famille des cytokines parmi les interférons (IFN), les interleukines (IL), les facteurs de nécrose tumorale (TNF) et les facteurs de croissance transformant (TGF) et hématopoïétique (CSF). Ces facteurs sont produits par différents types cellulaires et peuvent être soit membranaires, soit, le plus souvent, sécrétés dans le milieu extracellulaire suite à une stimulation (Mackay 1997, Samson, Aubry, and Parmentier 1999).

Les chimiokines ont pour fonction principale de recruter les cellules leucocytaires au niveau des sites inflammatoires en favorisant leur migration au sein de la paroi endothéliale. Elles jouent également un rôle important dans la différenciation physiologique des cellules souches de la moelle osseuse, mais aussi dans des contextes pathologiques au niveau de l'angiogenèse et de la prolifération des cellules tumorales. D'un point de vue fonctionnel, la superfamille des chimiokines peut être dissociée en deux groupes : les **chimiokines homéostatiques constitutives**, produites principalement par les organes lymphoïdes, impliquées dans la lymphopoïèse et l'immunosurveillance (Cyster 1999, Ngo *et al.* 1999); les **chimiokines inductibles pro-inflammatoires**, produites et activées au niveau des sites d'inflammation par les cellules tissulaires, à l'origine d'un recrutement leucocytaire (Moser and Willimann 2004). De façon générale, les populations leucocytaires expriment un panel de récepteurs spécifiques de certaines chimiokines, dont l'interaction chimiokine/récepteur permet le recrutement d'une population de cellules immunitaires en particulier. Par exemple, les neutrophiles expriment les récepteurs CXCR1-2 à leur surface et peuvent donc être recrutés par les chimiokines CXCL8, CXCL1 et CXCL2 (Singer and Sansonetti 2004). Cependant, la nomenclature officielle des chimiokines repose exclusivement sur leurs particularités structurales.

Chimiokines CC		Chimiokines CXC	
Nomenclature	Autre(s) noms	Nomenclature	Autre(s) noms
<i>CCL1</i>	I-309	<i>CXCL1</i>	GRO α , MGS α , GRO-1, NAP-3
<i>CCL2</i>	MCP-1, MCAF, TDCF, HC11	<i>CXCL2</i>	GRO β , MGS β , MIP-2 α , GRO-2
<i>CCL3</i>	MIP-1 α , LD78 α	<i>CXCL3</i>	GRO γ , MIP-2 β , GRO-3
<i>CCL3L1</i>	LD78 β	<i>CXCL5</i>	ENA 78
<i>CCL3L3</i>	LD78 β	<i>CXCL6</i>	GCP-2
<i>CCL4</i>	MIP-1 β , AT744.1, G-26, HC21	<i>CXCL7</i>	NAP-2, CTAPIII, β -TG
<i>CCL4L1</i>	AT744.2	<i>CXCL8</i>	IL-8, NAP-1, MDNCF, GCP-1
<i>CCL4L2</i>		<i>CXCL4</i>	PF4
<i>CCL5</i>	RANTES	<i>CXCL4L1</i>	PF4V1
<i>CCL7</i>	MCP-3	<i>CXCL9</i>	MIG, CRG-10
<i>CCL8</i>	MCP-2, HC14	<i>CXCL10</i>	IP-10
<i>CCL11</i>	Eotaxine	<i>CXCL11</i>	I-TAC, β -R1, H174, IP-9
<i>CCL13</i>	MCP-4, CK- β 10, NCC-1	<i>CXCL12</i>	SDF-1, PBSF
<i>CCL14</i>	HCC-1, MCIF, CK- β 1, NCC-2	<i>CXCL13</i>	BLC, BCA-1
<i>CCL15</i>	HCC-2, LKN-1, MIP-1 γ , NCC-3	<i>CXCL14</i>	BRAK, BMAC, Bolekine
<i>CCL16</i>	HCC-4, LEC, LCC-1, NCC-4	<i>CXCL16</i>	SR-PSOX
<i>CCL17</i>	TARC, ABCD-2	<i>CXCL17</i>	DMC, VCC-1
<i>CCL18</i>	DC-CK-1, PARC, AMAC-1, MIP-4		
<i>CCL19</i>	MIP-3 β , ELC, exodus-3, CK- β 11		
<i>CCL20</i>	MIP-3 α , LARC, exodus-1, CK- β 4		
<i>CCL21</i>	SLC, 6Ckine, exodus-2, CK- β 9		
<i>CCL22</i>	MDC, STCP-1		
<i>CCL23</i>	MPIF, MIP-3, CK- β 8, CK- β 8-1		
<i>CCL24</i>	MPIF-2, Eotaxine-2, CK- β 6		
<i>CCL25</i>	TECK, CK- β 15		
<i>CCL26</i>	Eotaxine-3, MIP-4 α , IMAC		
<i>CCL27</i>	CTACK, ILC, ESKINE, PESKY		
<i>CCL28</i>	MEC		

Chimiokines XC	
Nomenclature	Autre(s) noms
<i>XCL1</i>	Lymphotactine- α , SCM-1 α
<i>XCL2</i>	Lymphotactine- β , SCM-1 β

Chimiokines CX3C	
Nomenclature	Autre(s) noms
<i>CX3CL1</i>	Fractalkine, Neurotactine

Tableau 11 : Nomenclature officielle des chimiokines et leurs noms alternatifs

3.1.2. Classification structurale

A ce jour, la nomenclature officielle dénombre 48 chimiokines humaines qui partagent une structure tridimensionnelle commune de trois feuillets β et une hélice α dans leur partie C-terminale (Baggiolini, Dewald, and Moser 1997, Mackay 1997). Malgré une structure fonctionnelle similaire, les chimiokines diffèrent au niveau de leur séquence en acide aminé. Elles possèdent tout de même un motif particulier de quatre résidus cystéines conservés capables de former deux ponts disulfures. La classification structurale des chimiokines dépend donc du nombre d'acide aminé X présents entre les deux premières cystéines de leur partie N-terminale et détermine leur appartenance à l'une des quatre sous-familles définies par la nomenclature officielle (Rossi and Zlotnik 2000) (**Figure 15**). Chaque nom de chimiokine est défini en fonction de sa classification structurale, à laquelle s'ajoute le suffixe « L » pour « ligand » (**Tableau 11**).

La sous-famille des **chimiokines CXC** est caractérisée par la présence d'un acide aminé qui sépare les deux premières cystéines au niveau de leur séquence. Elle comptabilise 17 membres qui ont la particularité de se subdiviser en deux sous-groupes en fonction de la présence ou non du motif conservé E-L-R de trois acides aminés (glutamate-leucine-arginine) : ELR+ et ELR- (Zlotnik and Yoshie 2012, Burtreau, Willems, and Kettmann 2007). Ce motif est à l'origine des propriétés angiogéniques et chimio-attractantes des neutrophiles chez les chimiokines CXC. Le membre le plus étudié est l'interleukine-8 (IL-8/CXCL8), petite protéine de 8 kDa produite par de nombreux types cellulaires et responsable notamment du recrutement et de l'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales (Baggiolini 2015, Samson, Aubry, and Parmentier 1999).

La sous-famille des **chimiokines CC** est caractérisée par leurs deux premières cystéines adjacentes au niveau de leur séquence. Elle dénombre 28 membres différents chez l'homme (Zlotnik and Yoshie 2012, Rossi and Zlotnik 2000).

La sous-famille des **chimiokines C** qui ne possèdent qu'une seule cystéine en N-terminale, manifestant un unique pont disulfure. Cette sous-famille est représentée par 2 membres (Rossi and Zlotnik 2000, Zlotnik and Yoshie 2012).

La sous-famille des **chimiokines CX3C** est caractérisée par la présence de trois acide-aminés qui séparent les deux premières cystéines au niveau de leur séquence. Un seul et unique

membre membranaire compose cette sous-famille, il s'agit de la fractalkine (CX3CL1) (Zlotnik and Yoshie 2012, Bazan *et al.* 1997).

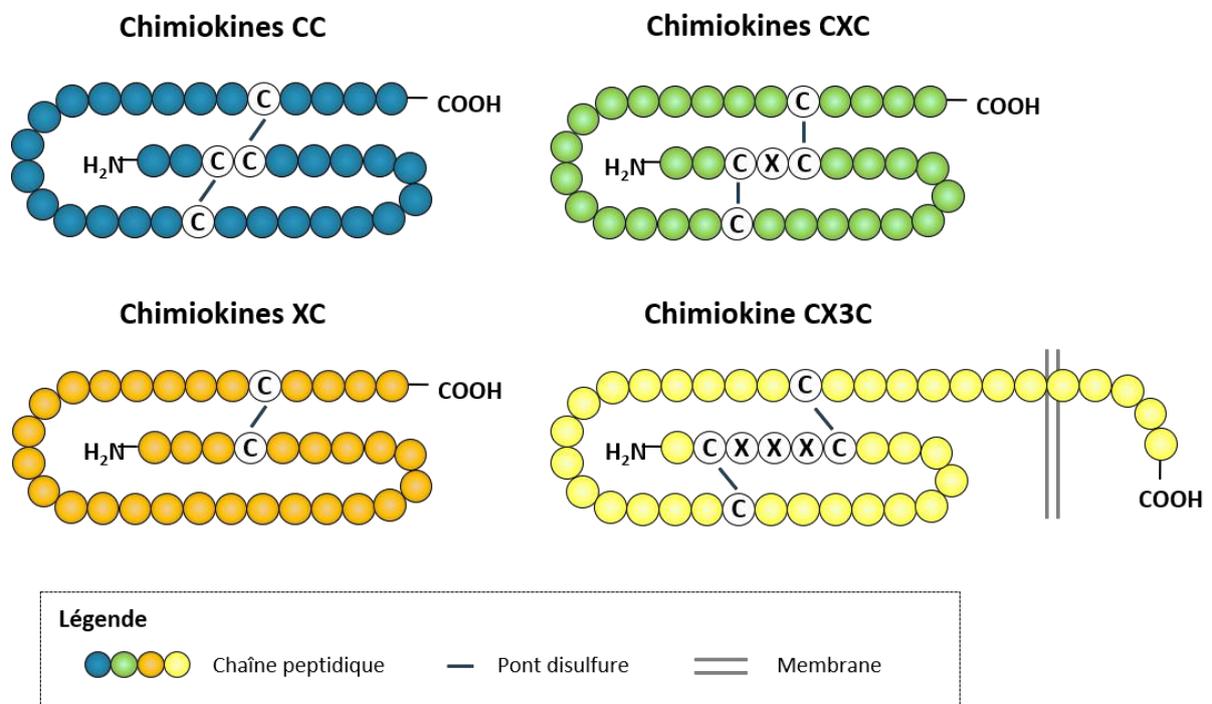


Figure 15 : La classification structurale des chimiokines

Il existe quatre sous-familles de chimiokines fonctionnelles : les chimiokines CC (en bleu), les chimiokines CXC (en vert), les chimiokines XC (en orange), la chimiokine CX3C (en jaune).

3.1.3. Récepteurs chimiokines

L'activité biologique des différentes chimiokines est exercée à travers des récepteurs exprimés à la surface des cellules. Ces récepteurs possèdent une structure commune de 7 domaines transmembranaires en hélice α , à l'origine de trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires. Ils appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Kuang *et al.* 1996)

La nomenclature des récepteurs chimiokines repose sur le groupe de ligands chimiokines auxquels ils appartiennent et sur l'association du suffixe « R » pour « Récepteur ». Par exemple, les récepteurs CXCR1 et CXCR2 peuvent fixer le ligand CXCL8 (Wu, LaRosa, and Simon 1993). Ainsi, les récepteurs chimiokines se subdivisent en cinq groupes : les 6 **récepteurs CXCR** (CXCR1 à 6), activés par la liaison des chimiokines CXC ; les 10 **récepteurs CCR**, activés par la liaison des chimiokines CC ; le **récepteur XCR1**, activé par la liaison des chimiokines XC, le **récepteur CX3CR1**, activé par la liaison de CX3CL1 et les 3 récepteurs « leurres », D6, DARC (*Duffy Antigen Receptor for Chemokines*) et CCX-CKR (*ChemoCentryx, Chemokine Receptor*) (Ali and Lazennec 2007, Burteau, Willems, and Kettmann 2007). Chaque catégorie de récepteur peut lier une à plusieurs chimiokines de sa sous-famille correspondante, à l'exception des récepteurs « leurres ». En effet, même si le récepteur D6 se lie uniquement aux chimiokines CC, les récepteurs DARC et CC-CKR peuvent lier à la fois les chimiokines CC et CXC (Comerford and Nibbs 2005). Ces récepteurs, aussi qualifiés de « silencieux », ne traduisent aucun signal suite à leur liaison avec une chimiokine mais régulent leur biodisponibilité par leur internalisation dans la cellule (Rot 2005, Locati *et al.* 2005, Comerford *et al.* 2006) (**Figure 16**).

La multiplicité de reconnaissance de chimiokines par les récepteurs apporte une **redondance dans l'activité biologique** de ces facteurs solubles. En effet, ces répétitions de signaux peuvent impliquer les chimiokines dans différents processus pathologiques et notamment dans la progression tumorale.

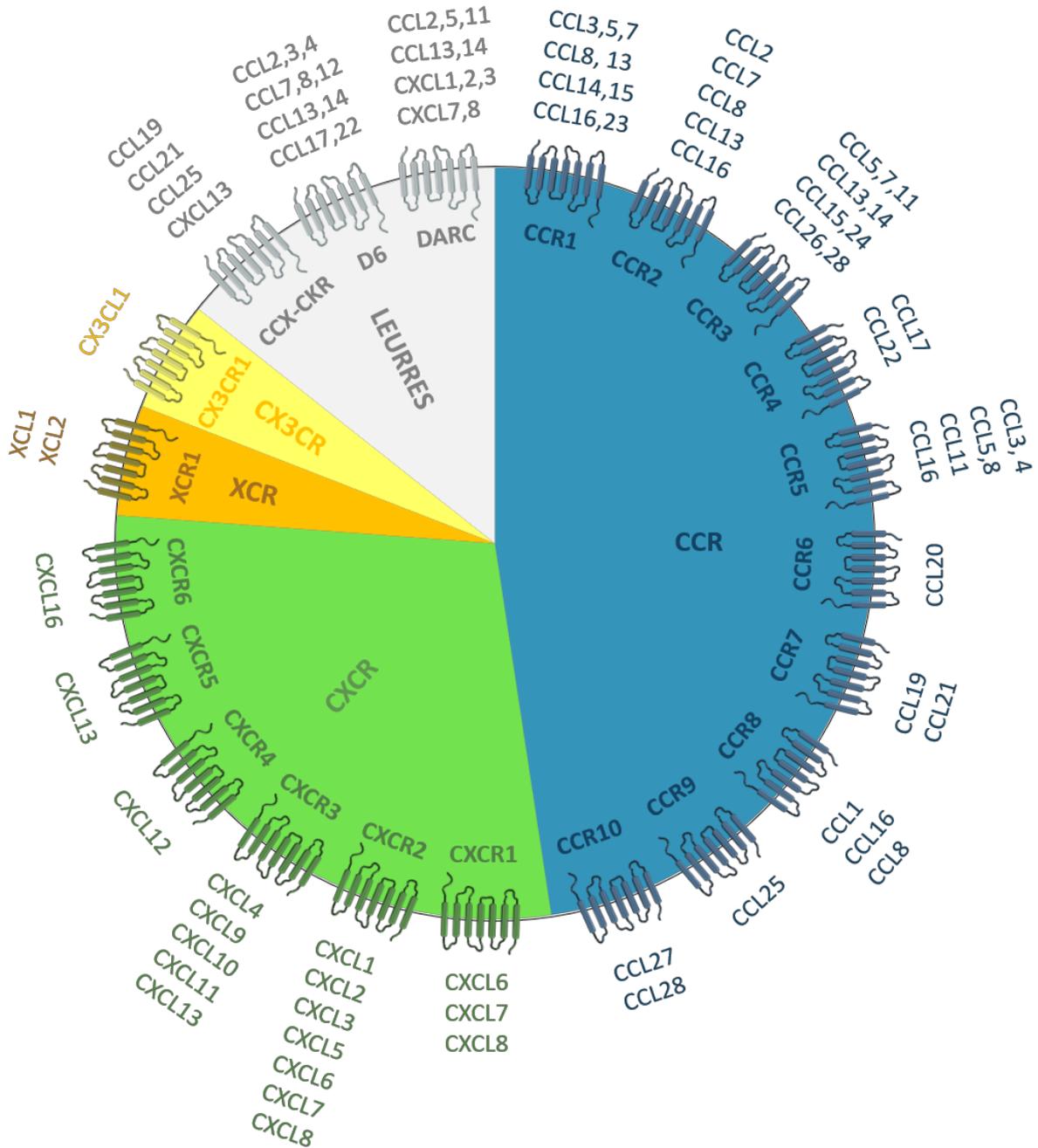


Figure 16 : Les récepteurs des chimiokines et leurs ligands potentiels

Il existe cinq catégories de récepteurs : les récepteurs CCR qui se lient aux chimiokines CC (en bleu), les récepteurs CXCR qui se lient aux chimiokines CXC (en vert), le récepteur XCR qui se lie aux chimiokines XC (en orange), le récepteur CX3CR qui se lie à la chimiokine CX3C (en jaune) et les récepteurs leurres qui ne transduisent pas de signal (en gris). Adapté d'après (Balkwill 2004)

3.2. Les chimiokines dans la progression tumorale

La présence de cellules inflammatoires et/ou immunitaires au sein du microenvironnement tumoral témoigne d'une synthèse locale de chimiokines, responsables de leur recrutement. Outre les propriétés physiologiques de ces facteurs solubles, les chimiokines produites par les cellules tumorales et/ou stromales peuvent aussi être impliquées dans la croissance et la prolifération tumorale, l'angiogenèse, les métastases et l'immunité tumorale.

En effet, l'expression des chimiokines et de leurs récepteurs est régulée dans de nombreux cancers. De façon générale, plusieurs études montrent une surexpression du récepteur CXCR4 dans les cellules cancéreuses à la fois pulmonaires, mammaires, hépatiques et coliques (Liu *et al.* 2015, Smith *et al.* 2004, Kim, *et al.* 2006). Dans les adénocarcinomes pulmonaires, la cytokine CXCL12 est d'ailleurs à l'origine de la survie cellulaire à travers son récepteur CXCR4 (Wagner *et al.* 2009). De plus, certaines chimiokines sont impliquées dans la croissance et la progression tumorale, comme CXCL1-3, CXCL8, CCL2 et CCL5 surexprimées par les cellules de mélanome (Payne and Cornelius 2002), ou encore CXCL10, un inhibiteur de la tumorigenèse dans les CBNPC (Arenberg *et al.* 1996). A l'inverse, le ligand CXCL8 est sécrété par les cellules tumorales et favorise leur croissance, leur survie et leur prolifération tout en participant à l'induction et au maintien de la TEM dans les CBNPC (Ha, Debnath, and Neamati 2017, Liu *et al.* 2016, Fernando *et al.* 2016). D'autre part, l'invasion tumorale est également facilitée par l'activation des gélatinases MMP-2 et -9 par CXCL8 (Zarogoulidis *et al.* 2014).

Une étude récente a également mis en évidence l'importance de l'axe CXCL8/CXCR1-2 dans la résistance aux drogues anti-cancéreuses des cellules de carcinomes pulmonaires (Fernando *et al.* 2016, David *et al.* 2016). Le facteur CXCL8 joue donc un rôle majeur dans les propriétés pro-tumorales des cellules cancéreuses et notamment en stimulant l'expression du facteur vasculaire VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) associé au recrutement et à la prolifération des cellules endothéliales (Martin, Galisteo, and Gutkind 2009, Sparmann and Bar-Sagi 2004). Comme la chimiokine CXCL8, l'ensemble des chimiokines présentant le motif ELR+, c'est-à-dire CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, favorise l'angiogenèse contrairement aux chimiokines ELR- que sont CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11 et CXCL14 (Strieter *et al.* 1995) ; à l'exception de la chimiokine CXCL12 qui ne possède pas de motif ELR et qui arbore pourtant des propriétés angiogéniques importantes (Tachibana *et al.* 1998).

Les propriétés angiogéniques des chimiokines favorisent également l'invasion tumorale par la circulation des cellules cancéreuses. En effet, les cellules tumorales peuvent également synthétiser des chimiokines qui, en recrutant différents types cellulaires, peuvent favoriser la formation d'une niche pré-métastatique à l'origine des métastases. La formation d'un microenvironnement tumoral par le chimiotactisme de CTCs favorise la croissance et le développement d'une nouvelle tumeur secondaire par les cellules cancéreuses (Chow and Luster 2014, Ali and Lazennec 2007). Des travaux de Müller *et al.* ont d'ailleurs mis en évidence l'importance de l'axe CXCL12/CXCR4 dans la mise en place de métastases mammaires dans le poumon (Muller *et al.* 2001). Cette étude montre également une forte expression du ligand CXCL12 dans les poumons, justifiant du tropisme pulmonaire particulier des cellules tumorales mammaires qui expriment le récepteur CXCR4 à leur surface. Les chimiokines pourraient donc être une des explications à l'origine des organes qui développent majoritairement plus de métastases comme le poumon, le foie, le cerveau, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse (Muller *et al.* 2001). De plus, une autre étude plus récente a montré que la régulation autocrine de CXCL12 sur CXCR4 induit la prolifération et l'invasion des cellules épithéliales d'adénocarcinome humain A549 en faveur des métastases pulmonaires (Dai *et al.* 2013). Par ailleurs, une majorité de chimiokines ELR+ se retrouvent surexprimées au niveau du site métastatique par rapport au site tumoral primaire, comme CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6 et CXCL8 (Bièche *et al.* 2007, De Larco *et al.* 2001)

Bien plus que des propriétés pro-tumorales et pro-angiogéniques, les chimiokines produites par les cellules tumorales sont capables de moduler la réponse immunitaire anti- et pro-tumorale (Chow and Luster 2014).

3.3. Les chimiokines et l'immunité tumorale

Des études de la dernière décennie ont mis en évidence le rôle central du récepteur CXCR3 dans la réponse anti-tumorale. Wendel *et al.* ont montré une diminution de l'infiltration de cellules *natural killer* (NK) dans les souris CXCR3^{-/-}, déplétées en récepteur CXCR3 (Wendel *et al.* 2008) tandis que Andersson *et al.* indiquent une activité anti-tumorale des cellules CD4⁺ et CD8⁺ dépendante de CXCR3 dans les cancers pulmonaires (Andersson *et al.* 2009). De plus, des travaux *in vivo* de souris déficientes pour le récepteur CXCR3 ont démontré une polarisation pro-tumorale des macrophages de type M2 (Oghumu *et al.* 2014). L'ensemble de

ces données associe le récepteur CXCR3 à un bon pronostic, *via* le recrutement des cellules effectrices impliquées dans l'élimination des cellules tumorales (NK et CD8+) mais également *via* la polarisation des macrophages de type M1 anti-tumorale (macrophages M1) (Hensbergen *et al.* 2005, Andersson *et al.* 2009, Wendel *et al.* 2008, Oghumu *et al.* 2014). De même, l'expression du récepteur CXCR5 par les cellules T CD4+ et CD8+ optimise le recrutement des cellules cytotoxiques par le ligand CCL5, favorisant l'activité anti-tumorale immunitaire (Gonzalez-Martin *et al.* 2011).

Paradoxalement, certaines chimiokines pro-tumorales vont moduler la réponse immunitaire en faveur de la progression tumorale par le recrutement de cellules immunosuppressives (Vesely *et al.* 2011). En effet, plusieurs axes de chimiokines/récepteurs sont à l'origine d'un recrutement de TAM (*tumor-associated macrophages*) et de cellules MDSC (*myeloid-derived suppressors cells*) comme CCR2/CCL2, CCR5/CCL5, CXCR2/CXCL5 et CXCR4/CXCL12 (Aldinucci and Colombatti 2014, Mantovani *et al.* 2004). Ces chimiokines peuvent aussi recruter les cellules immunosuppressives Tregs au sein de la tumeur, associées à un mauvais pronostic (Curiel *et al.* 2004). Les cellules Tregs sont elles-mêmes capables de produire des cytokines inhibitrices des réponses immunes innée et adaptative telles que l'IL-10 et le TGF- β (Josefowicz, Lu, and Rudensky 2012) tout en stimulant l'apoptose des cellules anti-tumorales NK (Olkhanud *et al.* 2009). Indirectement, les cellules tumorales peuvent même amener les cellules immunosuppressives Tregs à exprimer compétitivement le récepteur CXCR3 à leur surface, inhibant la réponse anti-tumorale Th1 en faveur de la réponse pro-tumorale Th2 (Hoerning *et al.* 2011, Redjimi *et al.* 2012).

Les chimiokines produites par les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement tumoral régulent à la fois les propriétés intrinsèques des cellules tumorales mais agissent également sur les cellules avoisinantes, conduisant parfois à l'inhibition de la réponse immune au profit de la progression tumorale.

Objectif de l'étude

Le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est clairement impliqué dans la progression métastatique des cellules tumorales. D'un point de vue moléculaire, la TEM se traduit par la diminution d'expression de molécules transmembranaires telles que la cadhérine-E, les claudines et l'occludine et la surexpression de protéines mésenchymateuses telle que la vimentine. La disparition des complexes jonctionnels intercellulaires fait intervenir une délocalisation de protéines sous-membranaires des jonctions serrées telles que les protéines ZO. En effet, lors de la TEM, *zonula occludens 1* (ZO-1), qui l'objet principal de nos travaux, est délocalisé de la membrane vers les compartiments cytoplasmique et nucléaire des cellules épithéliales dans lesquels il va alors agir comme un co-facteur de transcription capable d'activer l'expression de gènes pro-invasifs permettant le maintien de la TEM.

Jusqu'à présent, les études de la TEM se sont essentiellement focalisées sur les modifications phénotypiques intrinsèques qu'elle engendre. Cependant, la dissémination métastatique des cellules cancéreuses épithéliales repose également sur les interactions qu'elles peuvent établir avec les cellules de l'hôte au sein du microenvironnement tumoral. En effet, les travaux de Brysse *et al.* et Lesage *et al.*, réalisés au sein de notre laboratoire, ont permis d'établir une corrélation entre la délocalisation cyto-nucléaire de ZO-1 et l'expression de la cytokine pro-inflammatoire CXCL8/IL-8 dans les cellules invasives mammaires et bronchiques respectivement (Brysse *et al.* 2012, Lesage *et al.* 2017). De plus, une autre étude récente a également montré que les cellules présentant un phénotype de TEM positif (TEM+) expriment différents facteurs solubles capables d'influencer le recrutement de cellules inflammatoires.

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail est d'étudier le rôle de ZO-1 vis-à-vis du recrutement des cellules inflammatoires au sein du microenvironnement tumoral pulmonaire. De ce fait, l'établissement d'un lien éventuel entre la délocalisation cyto-nucléaire de ZO-1 lors des processus de TEM et le recrutement des cellules inflammatoires dans la mise en place d'un microenvironnement permissif et facilitateur est primordial pour la détermination d'un nouveau biomarqueur diagnostique et pourrait constituer une cible thérapeutique indispensable pour une meilleure prise en charge des patients.

Plus précisément, ce travail de thèse a pour but d'étudier :

- 1) L'influence de l'expression cyto-nucléaire de ZO-1 sur la sécrétion des chimiokines, et plus particulièrement la validation de la capacité de régulation de la chimiokine pro-inflammatoire IL-8 par ZO-1 dans nos modèles d'études
- 2) L'implication fonctionnelle de ZO-1 cyto-nucléaire dans le recrutement des cellules inflammatoires et/ou immunitaires *in vitro* et *in vivo*
- 3) La relation entre la localisation cyto-nucléaire de ZO-1 et l'infiltrat inflammatoire du microenvironnement tumoral chez les patients atteints de CBNPC

MATÉRIELS & MÉTHODES

I. Étude *in vitro* de l'influence de ZO-1 cyto-nucléaire sur l'expression de l'IL-8

1. Culture de lignées cellulaires adhérentes

Les lignées cellulaires humaines bronchiques utilisées proviennent de l'*American Type Culture Collection (ATCC®)*, Rockville, MD, États-Unis). Les lignées cellulaires 16HBE et Beas-2B proviennent de cellules bronchiques humaines normales immortalisées. Les cellules 16HBE ont été transformées par les oncogènes E6/E7 du virus HPV-16 tandis que les cellules Beas-2B ont été infectées avec l'adénovirus 12-SV40. La lignée tumorale BZR est issue de la lignée cellulaire Beas-2B infectée par l'oncogène viral H-Ras et la lignée tumorale A549 est issue d'un carcinome broncho-pulmonaire. Ces lignées cellulaires sont cultivées en boîtes de Pétri en polystyrène à fond plat de 10 cm de diamètre (*BD Falcon™*, Becton Dickinson, CA, États-Unis) dans du milieu DMEM (*Dubelcco's modified Eagle medium ; Gibco®*, Invitrogen, Carlsbad, CA, États-Unis) contenant du GLUTAMAX™ et supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF ; *Lonza*) décomplémenté, ainsi qu'avec de la pénicilline (100 U/mL) (*Gibco®*) et de la streptomycine (100 µg/mL) (*Gibco®*). L'induction en TEM des cellules A549 résulte d'un traitement de 48 h avec 5 ng/mL de TGF-β recombinant (*R&D System*, Minneapolis, États-Unis). Une fois atteint le niveau de confluence, les cellules sont rincées deux fois au PBS (*Phosphate Buffered Saline*, *Gibco®*), trypsinées avec de la trypsine-EDTA 0,05% 1X (*Acide Ethylène Diamine Tétracérique*, *Gibco®*) pour ensuite être réensemencées. L'entretien cellulaire est effectué en atmosphère humide à 37°C avec 5% de CO₂.

2. Modèle de chambre de Boyden modifiée

La capacité invasive des cellules est évaluée par des chambres de Boyden (*BD BioCoat Matrigel*, *BD Biosciences*, Bedford, MA, États-Unis). Ces chambres sont composées d'un insert avec une membrane microporeuse (pores de 8 µm de diamètre) recouverte de matrigel extrait de tumeurs EHS (*Engelbrecht-Holm-Swarm*) mimant la composition de la membrane basale. Après réhydratation des membranes en milieu de culture, 100 000 cellules dans du milieu sans chémo-attractant sont placées dans la chambre supérieure et du milieu avec 10% de SVF est ajouté dans la chambre inférieure. Les chambres sont incubées 24h à 37°C pour le screening des lignées bronchiques. Après incubation, les chambres sont rincées deux fois au PBS puis les

cellules sur la face supérieure sont enlevées à l'aide d'un coton-tige. Les cellules sont fixées avec du méthanol pendant 10 min à -20 °C puis les noyaux des cellules sont marqués avec du DAPI pendant 10 min à l'obscurité. La membrane est ensuite placée entre lame et lamelle avec du milieu de montage Aqua-Poly/Mount (*Polysciences Inc, Warrington, PA, États-Unis*). Sur un microscope motorisé à épifluorescence *Axiomager* (*Zeiss*), une image de la surface totale de chaque membrane est obtenue au grossissement x5 en mode mosaïque grâce au logiciel *Axiovision* (*Zeiss*). La totalité des cellules invasives retrouvées sur la face inférieure de la membrane est alors comptée à l'aide d'un plugin développé au laboratoire et utilisable à partir du logiciel *ImageJ*. Trois membranes par condition et trois expériences différentes ont été réalisées.

3. Analyse par immunocytofluorescence

Les cellules sontensemencées sur lamelles de verre de diamètre 14 mm et sont disposées par trois dans chaque puits d'une plaque 6 puits (*Tissue Culture Plate, Corning Incorporated, Life Sciences, Durham, États-Unis*). Lorsque les cellules ont atteint une confluence d'environ 80%, les lamelles sont rincées deux fois au PBS puis fixées au méthanol à -20°C pendant 10 min. Après aspiration du méthanol, les lamelles sont conservées à -20°C jusqu'à utilisation.

L'immunofluorescence débute par une étape de réhydratation des lamelles au PBS. Le blocage des sites antigéniques aspécifiques est ensuite réalisé pendant 30 min avec une solution de PBS/BSA 3% (v/v) (*Sigma-Aldrich, St Louis, MO, États-Unis*). Ensuite, les lamelles sont mises en contact avec l'anticorps murin anti-ZO-1 (*clone 1A12, Invitrogen*), dilué au 1/100^e dans une solution de PBS/BSA 1% (v/v) (*Sigma-Aldrich, St Louis, MO, États-Unis*), pendant une nuit à 4°C en chambre humide. Le lendemain, les lamelles sont rincées trois fois 5 min au PBS puis incubées avec l'anticorps secondaire anti-souris couplé à un alexa fluor 488, dilué au 1/1000^e dans une solution de PBS/BSA 1% (v/v) à l'obscurité pendant 1 h à température ambiante. Après trois nouveaux rinçages au PBS, les lamelles sont incubées 10 min à température ambiante à l'obscurité avec une solution de DAPI (*Di Aminido Phenyl Indol, Molecular Probes*) diluée au 1/1000^e dans du PBS permettant ainsi la coloration des noyaux cellulaires en bleu. Pour finir, les lamelles sont rincées au PBS avant d'être montées sur lame avec le milieu de montage aqueux Aqua-Poly/Mount (*Polysciences Inc, Warrington, PA, États-Unis*) ou Citifluor (*Agar, Royaume-Unis*). Les lames sont ensuite conservées au moins 24h à

4°C à l'obscurité avant observation afin de préserver au mieux le signal fluorescent. L'acquisition des images est effectuée à l'aide d'un microscope *Axiolmager Z1* (Zeiss, Oberkochen, Allemagne) équipé d'une caméra *CoolSNAP™ FX* (Roper Scientific, Duluth, GA, États-Unis) ou au microscope confocal (Zeiss) respectivement. Les images acquises ont été traitées avec les logiciels *AxioVision* (Zeiss) et *Photoshop* (Adobe Systems, CA, États-Unis).

4. Transfections transitoires des lignées cellulaires

4.1. Transfection transitoire de l'ADNc de ZO-1

4.1.1. Vérification de la pureté des plasmides utilisés par PCR

Le vecteur d'expression utilisé est le plasmide eucaryote pLNCX-ZO-1 (généreusement fourni par le Professeur W. Hunziker, Université de Singapour, Singapour) qui code pour l'ADNc du gène *Zonula occludens 1* humain (GenBank™ accession number L14837). Les vecteurs pLNCX vides sont utilisés comme contrôle négatif de transfection.

Afin de valider la pureté des plasmides utilisés, nous avons réalisé des PCR End Point à partir des ADN plasmidiques à raison de 5 µL d'ADNc à 10 ng/µL. Le mix de PCR a été réalisé avec des amorces sens et anti-sens du gène cible (**Tableau 13**) permettant de cibler spécifiquement les amplicons ZO-1, et selon les instructions définies dans le kit d'amplification « TaKaRa Taq™ R001A » (Takara Bio Compagny, Clontech Laboratories, Inc). Les échantillons sont amplifiés par un programme PCR par étapes de dénaturation, d'hybridation et d'élongation, de temps et températures différentes : 4°C >> 95°C 2 min >> (94°C 15 sec >> 60°C 30 sec >> 72°C 10 sec) x 18 cycles >> 72°C 2 min >> 4°C. Les produits PCR sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Pour cela, les produits de PCR sont chargés avec du bleu de charge [0,125% xylène cyanol (Serva) et 10% Ficoll (GE Healthcare) (m/v), filtrer à 0,45 µm] puis sont séparés en gel d'acrylamide 5% (40% acrylamide/Bis Solution 29 :1, Bio-Rad Laboratories) pendant 45 min à 180V. Afin de marquer l'ADN, les gels sont incubés 20 min avec un agent intercalent des acides nucléiques (*Gel Star Nucleic Gel Stain*, Lonza, Belgique). L'image des gels est ensuite obtenue à partir d'une caméra CCD refroidie à -30°C (*LAS-4000 Fulifilm*, Stamford, CT, Etat-Unis). Les amplicons de ZO-1 attendus sont de 96 paires de base.

4.1.2. Transfection transitoire d'ADNc par X-tremeGENE

La technique de transfection transitoire de l'ADN complémentaire (ADNc) est basée sur l'incorporation d'un vecteur codant pour l'ADNc de ZO-1 au sein des cellules cibles permettant l'expression transcriptionnelle et protéique transitoire de cette protéine. Le plasmide eGFP codant pour l'ADNc de la GFP (*Green Fluorescent Protein*) est utilisé comme contrôle d'efficacité de transfection. L'agent transfectant utilisé est l'*X-tremeGENE™ 9 DNA transfection reagent* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne).

Les cellules sont ensemencées en plaque 6 puits à raison de 100 000 cellules/puits pour les Beas-2B et 150 000 cellules/puits pour les BZR pendant 24h avec 2 mL de leur milieu d'entretien/puits. Une heure avant transfection, le milieu de culture est changé en DMEM +/- SVF. Pendant ce temps, les plasmides sont mélangés avec l'agent de transfection dans des tubes en polypropylène à raison de 2 µg de plasmide pour 3 µL d'*X-tremeGENE* dans 100 µL de DMEM. La solution de préparation des plasmides est ensuite incubée pendant 15 min à température ambiante. Au final, 100 µL de préparation plasmidique sont déposés par puits, permettant la transfection des cellules avec 1 µg/mL de plasmides concentrés. Les cellules sont incubées avec le mix de transfection pendant 48h. 48h post-transfection, les surnageants sont récupérés, centrifugés et conservés à -20°C avant d'être analysés protéiquement en ELISA et utilisés en modèle de *sponge assay*. Pour chaque transfection, les cellules sont rincées deux fois en PBS avant d'être conservées à -20°C pour vérifier l'expression transcriptionnelle et protéique de ZO-1 respectivement par RT-qPCR et par *western-blot*.

4.2. Transfection transitoire de siARN spécifique de ZO-1

4.2.1. Préparation des séquences scr/siARN utilisées

Le système des petits ARN interférents (siARN), initialement décrit par Richard Jorgensen en 1990, est basé sur l'incorporation transitoire de petits ARN double brins dans la cellule. La partie anti-sens du double brin, peut alors s'apparier spécifiquement à l'ARNm du gène cible, permettant ainsi sa dégradation ou inhibant sa traduction. Deux séquences de 19 nucléotides spécifiques de ZO-1 humain ont été sélectionnées dans la séquence codante du gène ZO-1 (*GenBank Accession No. L.14837; National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, MD, États-Unis; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>*). Ces séquences (**Tableau 12**), soumises à un « BLAST » dans le génome humain, permettent de générer deux séquences

Étude *in vitro* de l'influence de ZO-1 cyto-nucléaire sur l'expression de l'IL-8

siARN capables d'inhiber spécifiquement l'expression de l'ARN de ZO-1. Des séquences scrambled (scr), composées d'un mélange aléatoire de nucléotides de chacune des séquences siARN, ont été préalablement vérifiées comme ne reconnaissant aucune séquence dans le génome humain et sont utilisées comme contrôle. L'ensemble des séquences hybridées *scrambled* et siARN ZO-1 lyophilisées à 22 nmol provient de chez *Eurogentec*, et elles sont resuspendues dans 220 μL d' H_2O sans RNase pour obtenir des séquences à 100 μM .

Nom de la séquence	Séquences sens (s)/anti-sens(as)
siZO-1 n°1	s : 5'-GUUUAUCGAGCGAUCUCAU-3' as : 5'-AUGAGAUCGUCGUAUAAC-3'
siZO-1 n°2	s : 5'-GGAGGAAACAGCUAUAUGG-3' as : 5'-CCAUAUAGCUGUUUCCUCC-3'
scr siZO-1 n°1	s : 5'-GUCUAGUCUAGACGAUACU-3' as : 5'-AGUAUCGUCUAGACUAGAC-3'
scr siZO-1 n°2	s : 5'-GACAGGUUAGUCGAGAGAA-3' as : 5'-UUCUCUCGACUAACCUGUC-3'

Tableau 12 : Séquences des petits ARN interférents (siRNA) ZO-1 utilisés

4.2.2. Transfection par précipitation au phosphate calcique

Les cellules sontensemencées en plaque 6 puits à raison de 100 000 cellules/puits pour les Beas-2B et 150 000 cellules/puits pour les BZR pendant 24h avec 2 mL de leur milieu d'entretien/puits. Une heure avant transfection, le milieu de culture est renouvelé et les cellules sont transfectées avec un mix des deux séquences scrambled ou siARN par précipitation au phosphate calcique.

Pour chaque condition, 880 μL d' H_2O milliQ, 100 μL de CaCl_2 (250 mM), 20 μL de mix scrambled ou mix siARN à 20 μM sont mélangés dans un tube de polypropylène. Pour finir, 1 mL de tampon HBSP 2X [280 mM de NaCl, 1,5 mM de Na_2HPO_4 , 12 mM de glucose, 10 mM de KCl, 50 mM d'HEPES, pH 7,05] est ajouté au mélange par injection en tourbillon dans le tube. Après 90 secondes d'incubation à température ambiante, 200 μL de mix sont déposés dans chacun des puits. Le calcium associé au phosphate forme des précipités calciques, capables de se lier au siARN, permettant la pénétration des ARN interférents dans la cellule. Les cellules sont rincées deux fois au PBS, 16h post-transfection, pour éliminer les précipités et sont ensuite remises en DMEM + 10% SVF + 1% P/S pendant 24 à 48 h. Dans l'optique de récupérer un milieu sans sérum, après 24h de milieu + SVF, les cellules sont incubées dans du milieu sans

sérum pendant 48h. 48h (+ SVF) ou 72h (-SVF) post-transfection, les surnageants sont récupérés, centrifugés et conservés à -20°C avant d'être analysés par ELISA et utilisés en modèle de *sponge assay*. Pour chaque transfection, les cellules sont rincées deux fois en PBS avant d'être conservées à -20°C pour vérifier l'expression transcriptionnelle et protéique de ZO-1 respectivement par RT-qPCR et par *western-blot*.

5. Analyse de l'expression transcriptionnelle

5.1. Extraction et dosage des ARN à partir de lignées cellulaires

L'extraction des ARN totaux des lignées cellulaires étudiées est réalisée selon les instructions du kit *High Pure RNA isolation kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne)*. Les ARN fixés sur une colonne, sont élués dans 50 µL et conservés à -80°C. Par la suite, la pureté des échantillons et la concentration des ARN totaux sont déterminés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (*NanoDrop-1000, ThermoScientific, Courtaboeuf, France*).

5.2. RT-qPCR

La Réverse-Transcription (RT), permet la conversion de l'ARN en ADNc par la reverse transcriptase. Cette étape est réalisée à partir d'1 µg d'ARN totaux selon les instructions du kit *Transcription First Strand cDNA synthesis kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne)*. Les ADNc obtenus sont déposés en duplicat à raison de 10 ng d'ADNc par puits d'une plaque blanche *LightCycler480 Multiwell 96 (Roche)*. La PCR quantitative (qPCR) est effectuée selon les instructions du kit *FastStart Universal Probe Master (Roche Diagnostics GmbH, Allemagne)* et de l'appareil *LightCycler® 480 (Roche Diagnostics GmbH, Allemagne)*. Les couples d'amorces sens et anti-sens (*Eurogentec, Belgique*) utilisés sont référencés dans le tableau suivant (**Tableau 13**).

Gène (<i>taille amplicon</i>)	Séquences sens (s)/anti-sens(as)
ZO-1 (96 pb)	s : 5'-CGAAGGAGTTGAGCAGGAAA-3' as : 5'-GGACTCAGCAGTGTTCACCT-3'
IL-8 (62 pb)	s : 5'-AGACAGCAGACACACAAGC-3' as : 5'-ATGGTTCCTCCGGTGGT-3'
GAPDH (129 pb)	s : 5'-ACCAGGTGGTCTCTCTGAC-3' as : 5'-TGCTGTAGCCAAATTCGTTG-3'

Tableau 13 : Séquences nucléotidiques utilisées en RT-qPCR

Pour chaque gène cible étudié, une gamme issue d'ARN totaux de placenta humain sert de concentration de référence. L'ARNm du gène de la GAPDH sert de transcrite contrôle.

6. Analyse de l'expression protéique

6.1. Analyse de l'expression protéique par *western-blot* de ZO-1

6.1.1. Extraction et dosage protéique

L'extraction des protéines s'effectue à l'aide d'un tampon RIPA [Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Ipegal 1% (v/v), sodium déoxycholate 1% (p/v), iodoacetamide 5 mM, SDS 0,1% (p/v), pH 7,4] avec ajout d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases *Complete™ Mini* (Roche Diagnostics GmbH, Allemagne). Les lysats cellulaires obtenus sont incubés pendant 15 min sur la glace puis centrifugés pendant 10 min à 12 500 g à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Les surnageants protéiques sont récupérés puis dosés selon les instructions du kit de dosage *DC™ Protein Assay* (Bio-Rad, Hercules, CA, États-Unis). La lecture colorimétrique du dosage est effectuée à 750 nm avec un spectrophotomètre à microplaques *Multiskan® EX* (ThermoScientific, Waltham, MA, États-Unis). La gamme étalon utilisée est réalisée à partir d'une solution de BSA (*Bovine Serum Albumin*, Bio-Rad) de 31,25 à 1000 µg/mL avec un blanc à partir de la solution de tampon RIPA.

6.1.2. *western-blotting*

Le *western-blotting* est une technique semi-quantitative des protéines par séparation des protéines dénaturées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en fonction de leur poids moléculaire. Les protéines à faible poids moléculaire migrent plus loin que les protéines à haut poids moléculaire. La migration sur gel est suivie d'une étape de transfert sur membrane, permettant la mise en évidence spécifique des protéines à l'aide de complexes immunologiques Anticorps/Antigène (Ac/Ag) chimio-luminescents.

La quantité d'échantillons protéiques déposée varie entre 5 à 10 µg en fonction des lignes utilisées. Les échantillons sont dilués dans du tampon RIPA et sont chargés avec du bleu de charge [tampon Laemmli 5X (*Bio-Rad*); β-mercaptoéthanol 5% (v/v)]. La dénaturation des échantillons est effectuée à 100°C pendant 5 min permettant leur analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% (v/v) (*Euromedex*). La migration des échantillons est réalisée dans un tampon de migration refroidit [Tris 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1% (p/v)] à

température ambiante pour un ampérage constant (10 mA pour le gel de concentration et 20 mA pour le gel de séparation) à l'aide du système *Mini-Protean[®]III* (Bio-Rad). Après environ une heure et demi de migration, les protéines séparées dans le gel sont transférées sur une membrane PVDF (*Perkin Elmer, Boston, MA*), préalablement activée par du méthanol. Le transfert est effectué à voltage constant (100V) dans du tampon de transfert refroidit [Tris 48 mM, Glycine 39 mM, Méthanol 20% (v/v), SDS 0,03% (p/v)] sous agitation à 4°C pendant 1h. Suite au transfert, les membranes sont incubées pendant 2h à température ambiante sous agitation lente dans du tampon de blocage [Lait écrémé lyophilisé 5% (p/v), Tween-20 0,1% (v/v), PBS], permettant de bloquer les sites aspécifiques. Les membranes sont ensuite placées sur la nuit à 4°C sous agitation en bascule en présence d'anticorps primaire murin anti-ZO-1 (*clone 1A12, Invitrogen*) dilué au 1/1000^e dans du PBS-lait 5% (m/v). L'anticorps primaire monoclonal de souris anti-GAPDH (*clone 6C5, Millipore*), dilué au 1/75000^e sert de contrôle pour la quantité de protéines déposées. Le lendemain, une série de rinçages de une fois 15 min et deux fois 5 min est réalisée dans du PBS-T [PBS, Tween-20 0,1% (v/v)]. Les membranes sont ensuite incubées en présence d'un anticorps secondaire capable de reconnaître l'espèce de l'anticorps primaire. Ces anticorps secondaires sont conjugués à une HRP (*horse raddish peroxydase*) et dilués selon les instructions préconisées par le fournisseur (*DakoCytomation, Glostrup, Danemark*) dans du PBS-T-lait 5% (m/v) pendant 1h à température ambiante et à l'obscurité. Une série de rinçages de une fois 15 min et deux fois 5 min est de nouveau effectuée dans du PBS-T.

6.1.3. Révélation du signal protéique et analyse

La révélation des membranes est réalisée à l'aide du kit *Enhanced Chemiluminescence (ECL prime, Pierce)* selon les instructions fournies et la chimioluminescence est détectée à l'aide de l'imager *Ammersham AI600* (*Ammersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare, Buckinghamshire, Royaume-Uni*). L'analyse quantitative des signaux chimioluminescents obtenus est réalisée à l'aide du logiciel *Multi-Gauge (Fujifilm)*. Les valeurs obtenues par unité arbitraire de densité de pixel pour les protéines étudiées sont normalisées par rapport aux valeurs obtenues pour le gène de ménage GAPDH.

6.2. Analyse de l'expression de CXCL8/IL-8 par ELISA

6.2.1. Obtention des milieux conditionnés

Les milieux de culture conditionnés sont obtenus à partir des cultures des lignées cellulaires Beas-2B et BZR transfectées de manière transitoire, soit par un modèle de surexpression par un vecteur codant l'ADNc de ZO-1, soit par un modèle d'inhibition par siARN dirigé spécifiquement contre ZO-1. Ces milieux sont établis selon les protocoles de transfections précédemment détaillés (section M&M - I.4). Après 48h d'incubation, les surnageants de culture de chaque condition (Ctrl et condition ZO-1) sont récoltés en conditions stériles. Afin d'éliminer les débris cellulaires, ces milieux sont centrifugés à 1 500 rpm pendant 5 min puis stockés à -20°C jusqu'à utilisation. Au préalable de la congélation, un aliquot de 250 µL de chaque milieu conditionné est prélevé pour analyser l'expression de l'IL-8 en ELISA.

6.2.2. Dosage de l'expression de l'IL-8 par ELISA

Le principe du dosage protéique par ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) est de déterminer une concentration de l'ordre du pg/mL d'une cytokine d'intérêt exprimée dans un surnageant de culture. Cette technique immuno-enzymatique indirecte repose sur l'interaction de complexes spécifiques anticorps/antigène/anticorps biotinylé, assimilés à des « sandwichs antigéniques », qui forment un produit coloré par l'action d'une enzyme fixée à l'anticorps sur un substrat (**Figure 17**).

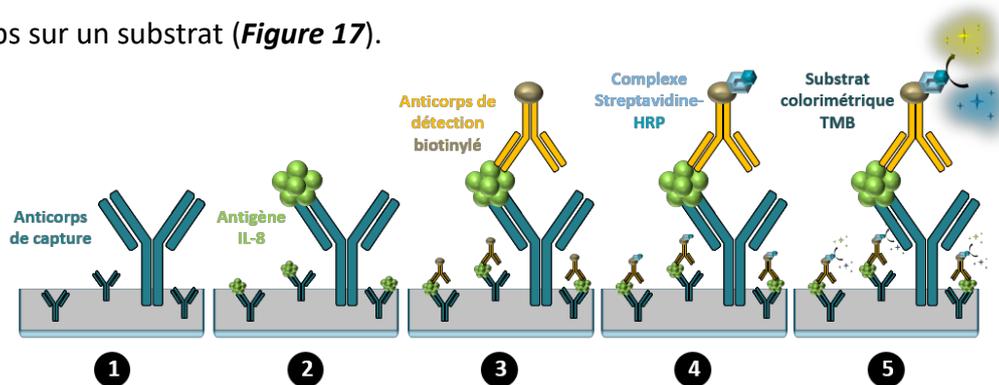


Figure 17 : Schématisation du principe de la technique du « sandwich ELISA »

(1) La plaque est coâtée avec un anticorps de capture CXCL8. (2) Les échantillons sont déposés et les antigènes CXCL8 présents se fixent à l'anticorps de capture. (3) L'anticorps de détection biotinylé, spécifique des antigènes fixés, est ajouté. (4) Le complexe streptavidine-HRP est ajouté et reconnaît spécifiquement la biotine de l'anticorps de détection. (5) Le substrat colorimétrique TMB incolore est ajouté et forme un produit coloré bleu au contact de l'enzyme HRP. La réaction colorimétrique est stoppée et la densité optique du produit coloré jaune ainsi formé est lu au spectrophotomètre et est proportionnelle à la quantité d'antigènes présents dans les échantillons.

L'expression de la protéine CXCL8/IL-8 dans chaque milieu conditionné est mesurée en duplicat selon les instructions du kit ELISA DuoSet® Human CXCL8/IL-8 (R&D systems, Minneapolis, États-Unis) sur une plaque 96 puits (Clear microplate, R&D System, Minneapolis, États-Unis). La réaction enzyme-substrat est effectuée grâce à une solution de substrat TMB single solution (Life Technologies, Frederick, MD, États-Unis). La lecture colorimétrique du dosage est effectuée à 450 nm et 570 nm (bruit de fond) avec un spectrophotomètre à microplaques Multiskan® EX (ThermoScientific, Waltham, MA, États-Unis). La gamme étalon utilisée est réalisée à partir d'une solution d'IL-8 recombinante (R&D System) de 31,25 à 2000 pg/mL avec un blanc à partir de la solution de tampon utilisée. Les valeurs obtenues en duplicat pour chaque milieu conditionné étudié sont normalisées au nombre de cellules.

7. Analyse de l'expression de 36 cytokines par *cytokine array*

Le principe du *cytokine array* repose sur l'analyse de l'expression d'une large gamme de cytokines produites dans nos différents milieux conditionnés, à partir d'une membrane de nitrocellulose présentant des anticorps spécifiques de facteurs solubles en duplicat.

Le *cytokine array* est réalisé à partir de milieux conditionnés de cellules Beas-2B dont l'expression de ZO-1 est réprimée transitoirement (section M&M - I.4) et selon les instructions du kit *Proteome Profiler Human* (R&D Systems, ARY005B). Brièvement, les milieux conditionnés sont récupérés, centrifugés 10 min à 1000 rpm pour éliminer les débris cellulaires, et dosés selon les instructions du kit de dosage *DC™ Protein Assay* (Bio-Rad, Hercules, CA, États-Unis) (section M&M - I.6.1.1). Les milieux dosés sont ensuite mélangés avec une série d'anticorps biotinylés dont le mix est incubé pendant une nuit à 4°C sur une membrane de nitrocellulose. Après une série de lavage, le complexe streptavidine/peroxydase de raifort est incubé avec la membrane. La révélation des membranes est réalisée à l'aide du kit *Enhanced Chemiluminescence (ECL prime, Pierce)* et la chemoluminescence est détectée à l'aide de l'imager *LAS-4000 (Fujifilm)*. L'analyse quantitative des signaux chimioluminescents obtenus en duplicat est réalisée à l'aide du logiciel *Multi-Gauge (Fujifilm)*. Les valeurs obtenues en duplicat par unité arbitraire de densité de pixel pour chaque facteur soluble étudié sont normalisées par rapport à la moyenne des valeurs obtenues pour les spots contrôles correspondants et au nombre de cellules.

II. Étude de l'influence de ZO-1 sur le recrutement de cellules inflammatoires *in vitro* et *in vivo*

1. Culture de lignée cellulaire en suspension

La lignée cellulaire humaine monocyttaire THP-1, issue du sang périphérique, provient de l'*American Type Culture Collection* (ATCC®, *authentification 2011, DSMZ, Germany*). Les cellules en suspension THP-1 sont cultivées en boîtes de Pétri en polystyrène à fond plat de 10 cm de diamètre (*BD Falcon™, Becton Dickinson, CA, États-Unis*) dans du milieu RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium ; Gibco®, Invitrogen, Carlsbad, CA, États-Unis*) contenant de la L-glutamine et supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (*SVF ; Gibco®*) décomplémenté, ainsi qu'avec de la pénicilline (100 U/mL) (*Gibco®*) et de la streptomycine (100 µg/mL) (*Gibco®*). La densité cellulaire des THP-1 est maintenue entre 0,5-1.10⁶ cellules/ mL de milieu et l'entretien est effectué en atmosphère humide à 37°C avec 5% de CO₂.

2. Modèle de chambre de chimiotaxie

La capacité migratoire de la lignée monocyttaire THP-1 en fonction des chimiokines exprimées par les cellules bronchiques invasives humaines Beas-2B et BZR est étudiée par un modèle en chambre de chimiotaxie (**Figure 18**). Une chambre se compose d'un insert de 6,5 cm de diamètre comportant une membrane microporeuse constituée de pores de 8 µm de diamètre (*Transwell®, Costar® Corning Incorporated 3422*). Disposées dans des plaques 12 puits, les membranes sont d'abord réhydratées 1 h à 37°C avec du milieu DMEM (*Dubelcco's modified Eagle medium ; Gibco®, Invitrogen, Carlsbad, CA, États-Unis*) contenant du GLUTAMAX™ sans sérum (sans chimioattractant).

Les cellules de la lignée monocyttaire THP-1 sont resuspendues à hauteur de 100 000 cellules dans 200 µL de milieu DMEM contenant du GLUTAMAX™ et supplémenté avec 0,5% d'albumin bovine (*BSA, Sigma-aldrich, Embryo Culture Tested, CAS 9048-46-8*) ainsi qu'avec de la pénicilline (100 U/mL) (*Gibco®*) et de la streptomycine (100 µg/mL) (*Gibco®*), et placées dans le compartiment supérieur de la chambre. Le compartiment inférieur contient 600 µL de milieux sans sérum conditionnés pendant 48h avec les cellules Beas-2B ou BZR transfectées transitoirement soit par un modèle de surexpression avec un vecteur codant ZO-1 (pLNCX vs

Étude de l'influence de ZO-1 sur le recrutement inflammatoire *in vitro et in vivo*

ZO-1 - section M&M – I.4.1) soit par un modèle d'inhibition par siARN (scr vs siZO-1 –section M&M - I.4.2). Un milieu contenant du DMEM + 1% P/S + 10% SVF a été utilisé comme contrôle positif. Après 7 à 24 h d'incubation à 37°C, les cellules THP-1 qui ont migré dans le compartiment inférieur de la chambre du transwell sont récupérées puis comptées au *cell counter* (*ADAM automated cell counter*). Les résultats sont exprimés en fois d'induction et sont déterminés par normalisation aux valeurs de chaque contrôle respectif.

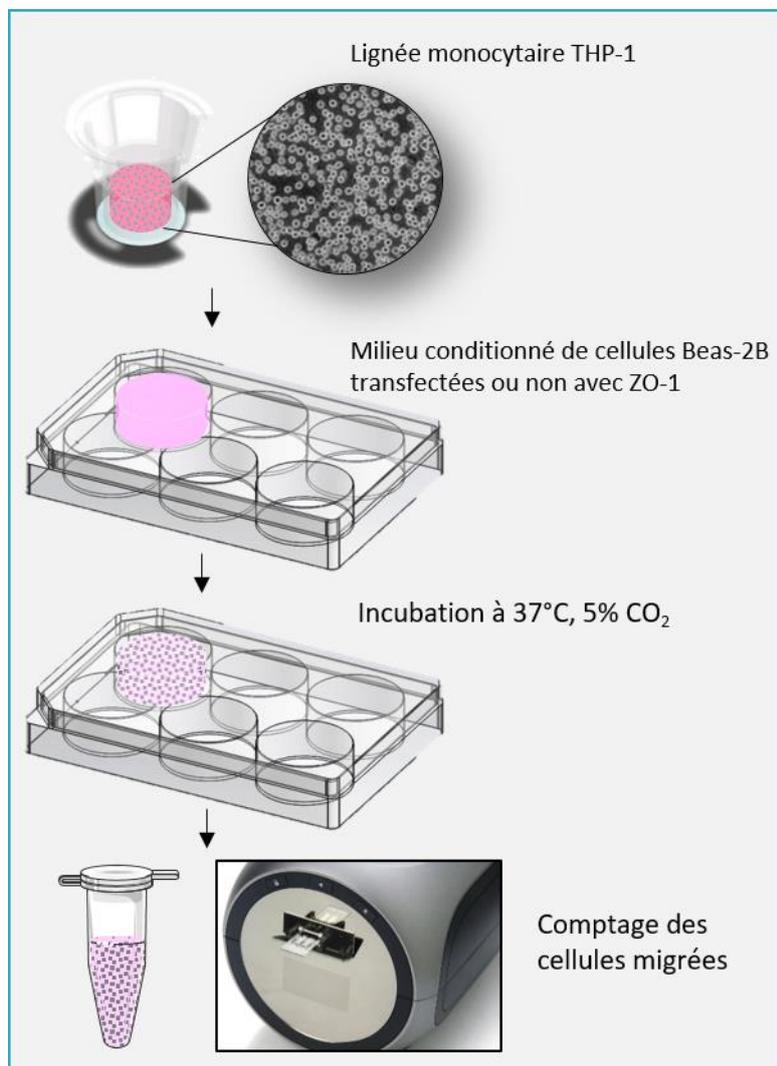


Figure 18 : Schématisation du protocole de transmigration de la lignée monocyttaire THP-1 utilisé

3. Modèle *in vivo* murin de *sponge assay*

Le modèle *in vivo* murin de *sponge assay* a été développé au sein du laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement (LBTD) pour étudier l'angiogenèse et la lymphangiogenèse chez la souris (Van de Velde *et al.* 2018). Cette expérimentation a été adaptée pour étudier le recrutement de cellules inflammatoires *in vivo* et repose sur le principe d'implanter des éponges imbibées de milieux conditionnés de cellules en sous-cutané dans l'oreille des souris. Après 3 à 21 jours, un recrutement cellulaire au sein de l'éponge est étudié (**Figure 19**).

3.1. Préparation des éponges

Des souris mâles BALB/cByJ âgées de six semaines provenant de chez Charles Rivers (*Chatillon-sur-Chalaronne, France*) ont été utilisés à la 7^{ème} semaine, favorisant l'adaptation de l'animal avant l'expérimentation pendant 1 semaine. Ces expérimentations ont été évaluées sur le plan éthique par le comité d'éthique animal de l'Université de Liège (*Liège, Belgique*) et ont été approuvées et certifiées conformes par l'autorisation n°1599. Des éponges chirurgicales en gélatine Gelfoam® 12-7 mm (*Pfizer, Puurs, Belgique*) sont détaillées en petit cylindre de 5 mm de diamètre à l'aide d'un trocart de biopsie (*Stiefel*) en conditions stériles. Les éponges sont ensuite imbibées de 50 µL de milieux conditionnés de cellules Beas-2B dont l'imprégnation s'effectue par des mouvements rotatifs de l'éponge dans le milieu. Après 15 min d'incubation à 37°C, les éponges sont enrobées d'une couche de collagène [Collagène Serva 47254.01 0.2% 7,5X (v/v), Bicarbonate de sodium 18,6 mg/mL 1,5X (v/v), milieu HBSS 10X (v/v), ajuster au pH neutre avec NaOH 1N] puis incubées 1h à 37°C dans une plaque 96 puits (*Corning Incorporated, Life Sciences, Durham, États-Unis*).

3.2. Opération des souris

Les souris sont anesthésiées par injection péritonéale d'une solution de kétamine/xylazine (1 :2) [Kétamine 1000 (100 mg/mL), Ceva Santé Animale/ROMPUN® 2% (20 mg/mL), *Bayer, Machelen, Belgique*]. Une incision à la base de l'oreille est effectuée permettant l'implantation des éponges en sous-cutané entre les deux couches de peau des oreilles de souris à l'aide d'une pince fine. Deux points de suture sont effectués au niveau de l'incision et les éponges sont laissées pendant 3 à 6 jours pour des temps précoces et pendant 3 semaines pour des temps tardifs.

3.3. Récupération, conservation et préparation des échantillons

La mise à mort des animaux s'effectue par dislocation des vertèbres suite à une anesthésie gazeuse à l'isoflurane. Par la suite, les oreilles sont excisées et fixées dans le formol pendant 3 à 4 h. S'en suit l'étape de déshydratation qui s'effectue par des bains successifs de deux fois 1h d'éthanol 70% (v/v) puis 95% (v/v), d'isopropanol puis de xylène. Pour finir, les échantillons de tissus sont plongés dans un bain de paraffine une nuit à 60°C. Le lendemain, après un nouveau bain propre de paraffine, les échantillons sont inclus en bloc de paraffine conservés à 4°C. Pour chaque souris, trois coupes de 5 µm d'épaisseur à différents plans de l'éponge sont réalisées à l'aide d'un microtome.

4. Analyse des populations cellulaires recrutées

4.1. Coloration au May-Grünwald-Giemsa (MGG)

Les lames sont colorées dans des bains successifs de colorants en commençant par le colorant May-Grünwald pur (*Merck Millipore*) pendant 1 min, puis de nouveau dans du May-Grünwald (*Merck Millipore*) dilué au ½ dans de l'adjuvant pour hématologie 50X (*Biolon*) pendant 2 min. Après un rinçage rapide dans de l'H₂O distillée, les lames sont colorées dans une solution de Giemsa (*Merck Millipore*), dilué au 1/20^e dans de l'adjuvant pour hématologie 50X (*Biolon*). Après un nouveau rinçage à l'H₂O distillée, les lames sont montées entre lame et lamelle avec du milieu de montage permanent Eukitt (*Sigma Aldrich*). L'acquisition des images des lames est réalisée à l'aide du microscope *Nikon Eclipse Ci* équipé d'une caméra *Nikon DS Fi2* (*Nikon France, Chassigny-sur-Marne, France*).

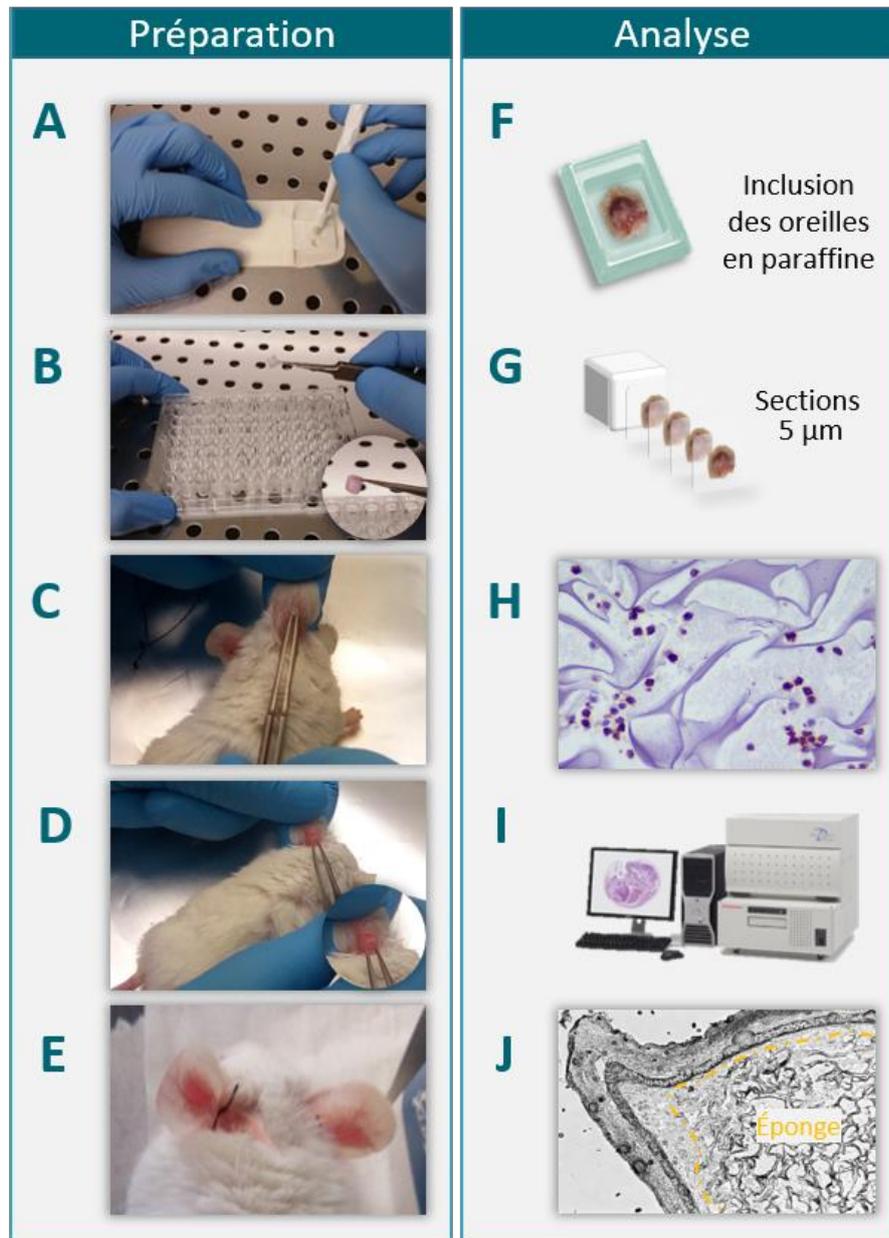


Figure 19 : Schématisation du protocole de *sponge assay* utilisé

(A) Des éponges cylindriques sont détaillées à l'aide d'un trocart dans une éponge chirurgicale (B) Les éponges sont ensuite imbibées de milieux conditionnés puis enrobées de collagène. (C) Suite à une incision à la base de l'oreille de la souris, (D) l'éponge est insérée dans l'oreille de la souris, (E) puis des points de suture sont réalisés pour fermer la plaie. (F) Après 3 à 21 jours d'implantation, les éponges sont récupérées, fixées, déshydratées puis incluses en paraffine. (G) Des coupes de 5 µm sont réalisées dans différents plans de l'éponge et (H) des colorations/immunomarquages sont réalisés. (I) Par la suite, les coupes immuno-marquées sont scannées (J) puis la surface de l'éponge est délimitée à l'aide du logiciel ImageJ, permettant les quantifications automatiques des différentes populations cellulaires marquées

4.2. Immunohistochimie (IHC)

Les coupes sont déparaffinées dans deux bains successifs de xylène pendant 10 et 5 min, puis réhydratées dans une série de bains de 3 min dans des solutions d'éthanol de concentration dégressive [100%, 95% puis 70% (v/v)] pour terminer par trois bains rapides d'H₂O milliQ. Le démasquage des sites antigéniques est réalisé au bain marie 95°C pendant 30 min dans une solution de tampon *Citrate Based 100X* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, États-Unis) à pH 6,0. Après deux rinçages au PBS, le blocage des peroxydases endogènes est effectué par une incubation dans une solution *BLOXALL™ Blocking Solution* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, États-Unis) pendant 10 min à température ambiante. Après deux nouveaux rinçages au PBS, la saturation des sites aspécifiques est maîtrisée par une solution de PBS/BSA 10% ou 3% (v/v) (*Sigma-Aldrich, St Louis, MO, États-Unis*) selon la poly- ou mono-clonalité respective de l'anticorps primaire utilisé. Les anticorps primaires, dilués dans une solution de PBS/BSA 3% ou 1% (v/v) (*Sigma-Aldrich, St Louis, MO, États-Unis*) selon leur poly- ou mono-clonalité respective, sont ensuite déposés sur les coupes et incubés pendant une nuit à 4°C. Les anticorps utilisés sont répertoriés dans le tableau suivant (**Tableau 14**).

Protéines	Espèces	Dilutions	Clones	Référence	Fournisseur
CD3	Souris	1/500 ^e	SP7	Ab16669	Abcam
N-élastase	Souris	1/1000 ^e	-	Ab68672	Abcam

Tableau 14 : Liste des anticorps utilisés pour les IHC *sponge assay*

Le lendemain, trois rinçages de 5 min sont effectués et les coupes sont ensuite incubées pendant 30 min à température ambiante dans une solution d'anticorps secondaire spécifique anti-lapin du kit *ImmPRESS™ Reagent kit* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, États-Unis). Trois nouveaux rinçages de 5 min au PBS sont réalisés et suivis par une incubation avec la solution de substrat chromogène *ImmPACT NovaRED™* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, États-Unis) pendant 5 min à température ambiante. Après deux rinçages rapides à l'H₂O milliQ, les coupes sont contre-colorées par de l'Hématoxyline de Carazzi [Hématoxyline cristallisée Merck 4202 0,5 g ; Iodate de Potassium Merck 5053 0,1 g ; Sulfate potassique

d'aluminium *Flucka 60060* 25 g ; glycérine *UCB 1384* 100 mL ; H₂O distillée 400 mL ; laissé murir deux mois à l'obscurité] pendant 30 sec. Après deux derniers rinçages successifs à l'H₂O milliQ, les coupes sont déshydratées par une série de trois bains d'éthanol de concentration progressive [70%, 95% puis 100% (v/v)] pour terminer dans deux bains successifs de xylène de 5 et 10 min. Pour finir, les coupes sont montées entre lame et lamelle avec le milieu de montage permanent *VectaMount* (*Vector Laboratories*).

4.3. Quantification des populations cellulaires recrutées

Une fois les immunomarquages anti-N-élastase et anti-CD3 réalisés, les coupes ont été numérisées au grossissement x20 à l'aide du scanner VS120 OLYMPUS (*Olympus France S.A.S, Rungis, France*) appartenant à la plateforme en Imagerie Cellulaire et Tissulaire de Reims (*PICT, URCA*). A partir de chaque coupe obtenue en image virtuelle, la zone d'éponge a été délimitée par traçage assisté à partir du logiciel *ImageJ*. La valeur déterminée pour chaque souris dépend de la moyenne de trois valeurs définissant les trois coupes immunomarquées par souris.

4.3.1. Quantification de la densité cellulaire

Les noyaux cellulaires colorés au DAPI ont été quantifiés par un programme MATLAB. Cette méthode quantitative automatique permet de comptabiliser la densité de noyaux colorés en bleu (DAPI) au sein de l'éponge par μm^2 permettant d'obtenir, au final, la densité de cellules.

4.3.2. Quantification des IHC anti-N-élastase et anti-CD3

Les cellules marquées ont été quantifiées par un programme MATLAB, permettant de déterminer la densité de cellules marquées, c'est-à-dire, la surface occupée par les cellules marquées par rapport à la surface de l'éponge ou la surface de la périphérie de l'éponge. Afin de limiter le taux d'erreur induit par le programme, la zone de l'épithélium contenant majoritairement beaucoup de bruit de fond, a été retirée pour la quantification des cellules marquées en périphérie de l'éponge. L'ensemble des valeurs obtenues ont été normalisées par rapport à la moyenne des contrôles.

5. Modèle *in vivo* murin de métastases

5.1. Préparation des cellules

Les cellules Beas-2B sont transfectées transitoirement soit par un modèle de surexpression de ZO-1 (section M&M – I.4.1), soit par un modèle d'inhibition de l'expression de ZO-1 (section M&M - I.4.2). Après 48h de transfection en milieu DMEM GLUTAMAX™ (*Dubelcco's modified Eagle medium ; Gibco®*) + 1% P/S [Pénicilline/Streptavidine (v/v), *Gibco®*] et supplémenté avec 10% de SVF (*Gibco®*), les cellules sont rincées deux fois au PBS puis trypsinisées à 37°C. Les cellules récupérées sont resuspendues dans du DMEM GLUTAMAX™ + 10% SVF + 1% P/S puis centrifugées 10 min à 1000 rpm. Par la suite, le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu DMEM non supplémenté et les cellules sont comptabilisées. Après une nouvelle centrifugation de 10 min à 1000 rpm, le culot est de nouveau resuspendu dans du milieu DMEM non supplémenté à raison de 1 million de cellules/mL.

5.2. Injection intraveineuse

Des souris mâles BALB/cByJ âgées de six semaines provenant de chez Charles Rivers (*Chatillon-sur-Chalaronne, France*) ont été utilisées à la septième semaine, favorisant l'adaptation de l'animal avant l'expérimentation pendant une semaine. Ces expérimentations ont été évaluées sur le plan éthique par le comité d'éthique animal de l'Université de Liège (*Liège, Belgique*) et ont été approuvées et certifiées conformes par l'autorisation n°1932.

Préalablement à l'injection, les souris sont placées 30 min sous une lampe U.V, favorisant la dilatation des veines. Les souris BALB/cByJ (n=5 / groupe) sont maintenues dans un système à contention et 100 000 cellules pulmonaires humaines invasives Beas-2B (100 µL) contrôles (pLNCX/scrambled) ou ZO-1 (ADNc ZO-1/siARN ZO-1) sont injectées dans la veine caudale latérale de la souris vigile à l'aide d'une aiguille 26G (*SurGuard® 2 Safety Needle, VWR, Terumo, Leuven, Belgique*). Les souris sont placées sous surveillance pendant 1 h post-injection, permettant de surveiller le risque d'embolie pulmonaire qui peut être provoqué par l'injection (**Figure 20**).

5.3. Récupération des poumons et broyat pulmonaire

Les souris sont mises à mort 24 h après l'injection des cellules tumorales. Les poumons sont prélevés et une partie d'un lobe droit pulmonaire pour chaque souris est isolé et fixé dans un bain de 3 h de paraformaldéhyde 4% (VWR) pour analyse IHC. Le reste du poumon est récupéré pour réaliser un broyat pulmonaire à l'aide d'un scalpel. Le broyat tissulaire est ensuite incubé dans de la collagénase type IV [*Life technologies*TM, *Gibco*[®], 0,1% (p/v)] pendant 1 h à 37°C sous agitation. La digestion du tissu est terminée par un flushing des échantillons à l'aide d'une aiguille 18G (*SurGuard*[®] 2 Safety Needle, VWR, Terumo, Leuven, Belgique). Après neutralisation de la collagénase par 2 mL de SVF, les échantillons sont centrifugés 5 min à 1200 rpm. Le culot cellulaire récupéré est ensuite incubé 5 min avec une solution de *Blood cell lysis buffer* (*Sigma Life Science*), permettant d'éliminer les globules rouges. Après neutralisation du tampon avec 8 mL de PBS, les échantillons sont centrifugés 5 min à 1200 rpm. Une fois le culot cellulaire resuspendu dans 5 mL de PBS contenant 2% de SVF (v/v), les échantillons sont filtrés à l'aide d'un filtre de nylon de 41 µm (*NY41, Millipore*) (**Figure 20**).

5.4. Isolement des cellules CD45+

Les échantillons filtrés sont centrifugés 5 min à 1200 rpm et le culot est ensuite resuspendu dans 10 mL de tampon MACS [BSA (*Sigma-aldrich*) 0,5% (p/v), EDTA 0,074 dans PBS/SVF 2% (v/v)] afin d'effectuer un rinçage. Suite à une nouvelle centrifugation de 5 min à 1200 rpm, le culot est resuspendu dans 180 µL de tampon MACS et 20 µL de microbilles magnétiques CD45 (*MACS Miltenyi Biotec, FSC*[®]) à raison de 20 millions de cellules par tube. Après homogénéisation, le mélange est incubé 15 min à 4°C. Un rinçage avec 4 mL de tampon MACS est effectué à l'aide d'une nouvelle centrifugation de 5 min à 1200 rpm. Le culot est alors resuspendu dans 500 µL de tampon MACS et la séparation magnétique est réalisée par fixation des colonnes *MS octo MACS* (*MACS Miltenyi Biotec, FSC*[®]) sur un aimant approprié. L'amorçage de la colonne est effectué avec 500 µL de tampon MACS et poursuivi par l'ajout du mélange billes/cellules sur la colonne. Ainsi, l'ensemble des cellules CD45+, associées aux billes magnétiques spécifiques, sont retenues dans la colonne. Une fois l'aimant retiré, l'éluat de cellules inflammatoires CD45+ est récupéré avec 1 mL de tampon MACS (**Figure 20**).

5.5. Analyse des populations cellulaires recrutées au FACS

La totalité des cellules CD45+ récupérées dans l'éluat est centrifugée 10 min à 1200 rpm et suspendue dans du PBS contenant 2% de SVF (v/v) à raison d'un million de cellules par 100 µL. Chaque tube effectué pour le passage au FACS contient 100 µL de suspension cellulaire (soit un million de cellules CD45+ par tube) et 1 µL de chaque anticorps utilisé. Le mélange est alors incubé 30 min à 4°C à l'obscurité. L'analyse FACS est réalisée à partir de différents anticorps répertoriés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 15**) et permet d'identifier plusieurs types cellulaires tels que les lymphocytes T (CD8, CD4 et NKT), les monocytes, les macrophages alvéolaires et interstitiels, les cellules dendritiques et les neutrophiles. Après l'incubation des cellules avec les différents anticorps, 1 mL de PBS est ajouté dans chacun des tubes. Après une dernière centrifugation de 10 min à 1200 rpm, le culot est resuspendu dans 200 µL de PBS et l'ensemble des tubes sont passés au *BD FACS Canto™ Flow Cytometer* (BD Bioscience). Les résultats sont exprimés en fois d'induction en fonction du pourcentage de cellules totales déterminé.

Protéines	Espèces	Fluorophores	Clones	Référence	Fournisseur
CD11c	Souris	PE Cy7	HL3	558079	<i>BD Biosciences</i>
CD193-CCR3	Souris	Alexa 647	-	557974	<i>BD Biosciences</i>
CD3	Souris	APC Cy7	17A2	560590	<i>BD Biosciences</i>
CD3e	Souris	B510	145-2C11	563024	<i>BD Biosciences</i>
CD4	Souris	PerCP-Cy5.5	RM4-5	550954	<i>BD Biosciences</i>
CD45	Souris	V450	30-F11	560501	<i>BD Biosciences</i>
CD8a	Souris	PE	53.6.7	553032	<i>BD Biosciences</i>
F4/80	Souris	PE	T45-2342	565410	<i>BD Biosciences</i>
Gr1 (Ly6G-Ly6C)	Souris	PerCP-Cy5.5	RB6-8C5	552093	<i>BD Biosciences</i>
Ly6B alloantigen RPF	Souris	PE	7/4	MCA771PE	<i>AbD Serotec</i>
NK1.1	Souris	PE Cy7	PK136	552878	<i>BD Biosciences</i>

Tableau 15 : Liste des anticorps utilisés au FACS

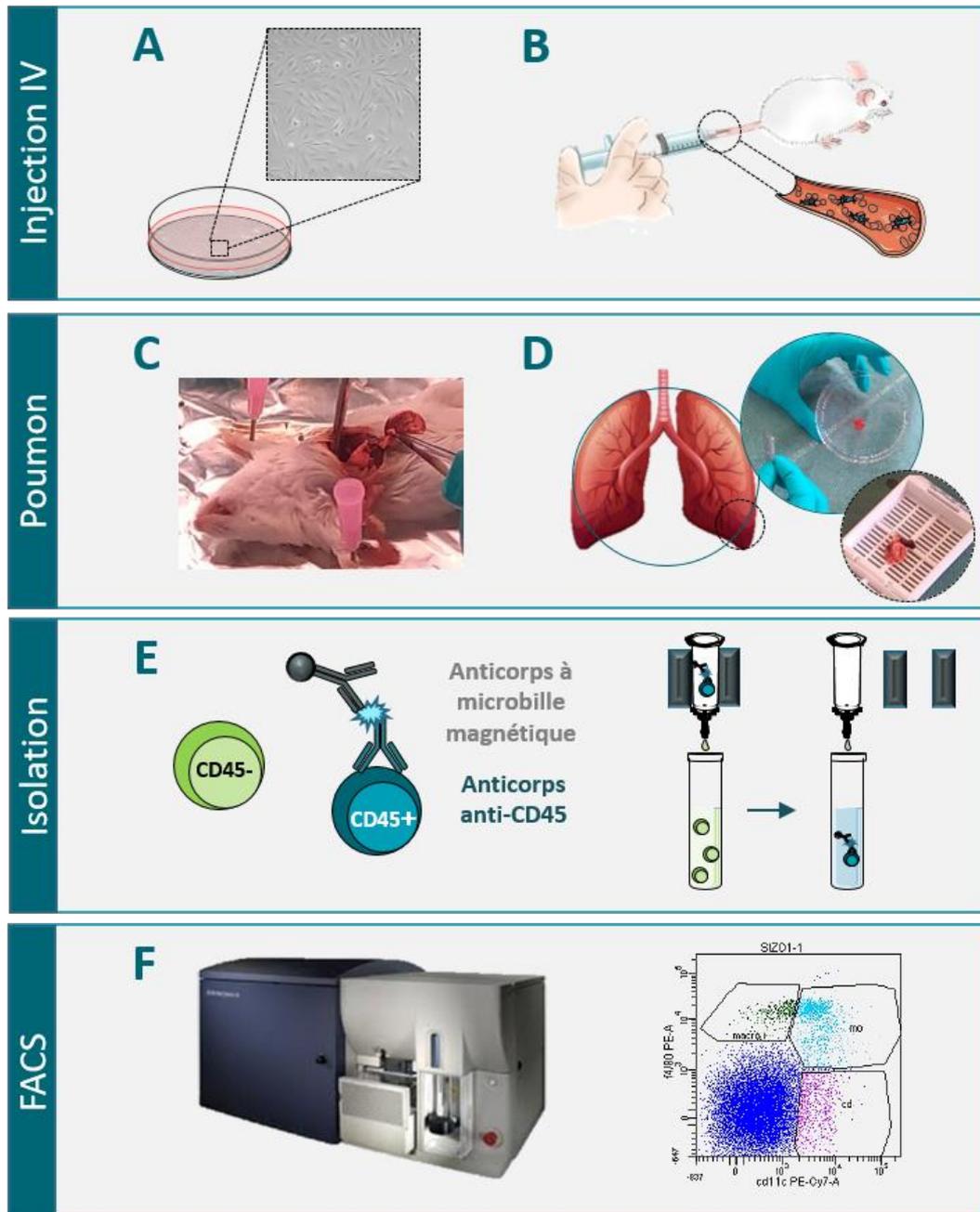


Figure 20 : Schématisation du protocole *in vivo* murin de métastases

(A) Les cellules pulmonaires invasives Beas-2B sont cultivées 48h puis trypsinisées pour être (B) injectées en intraveineuse dans la veine caudale d'une souris. (C) Après 24h post-injection, le poumon des souris est prélevé : (D) une petite partie d'un lobe est isolée pour l'immunohistochimie, le reste est broyé puis digéré. (E) Une fois le broyat pulmonaire purifié, des microbilles magnétiques couplées à un anticorps anti-CD45, spécifique des cellules inflammatoires, sont ajoutées dans l'échantillon cellulaire. Les cellules CD45+ fixées sont isolées à partir de colonne MACS par magnétisme. (F) Les cellules CD45+ isolées sont ensuite mises en contact avec un panel d'anticorps ciblant l'ensemble des populations inflammatoires étudiées afin d'effectuer une analyse par cytométrie en flux (FACS).

5.6. Immunomarquage anti-Ki67

Les analyses immunohistochimiques sont réalisées sur des sections de lobe pulmonaire récupéré 24h après l'injection en intraveineuse des cellules invasives Beas-2B. Les coupes sont déparaffinées dans deux bains successifs de xylène pendant 10 et 5 min, puis réhydratées dans une série de bains de 3 min dans des solutions d'éthanol de concentration dégressive [100%, 95% puis 70% (v/v)] pour terminer par trois bains rapides d'H₂O milliQ. Le démasquage des sites antigéniques est réalisé à 121°C en autoclave (*Prestige Medical, Servilab, France*) pendant 22 minutes à une pression de 1,4 bar dans la solution *Target Retrieval 10X (Dako, Carpintera, CA, États-Unis)* à pH 9,0. Les lames sont refroidies pendant 20 min avant d'être rincées deux fois à l'H₂O milliQ. Le blocage des peroxydases endogènes est effectué par une incubation dans une solution d'H₂O₂ 3% [*hydrogen peroxine 30% (v/v) ; Merck ; EMD Millipore Corporation, Allemagne*] pendant 20 min à température ambiante. Après deux nouveaux rinçages à l'H₂O milliQ, la saturation des sites aspécifiques est maîtrisée par une solution de PBS/BSA 10% (v/v) (*Sigma-Aldrich, St Louis, MO, États-Unis*) pendant 30 min à température ambiante. L'anticorps primaire monoclonal humain anti-Ki67 (clone EPR3610, Abcam, Ab92742) est dilué au 1/500^e dans une solution de PBS/BSA 1% (v/v) (*Sigma-Aldrich, St Louis, MO, États-Unis*) et incubé pendant 1 h à température ambiante. Après trois nouveaux rinçages de 5 min, les coupes sont incubées pendant 30 min à température ambiante dans une solution d'anticorps secondaire spécifique anti-lapin du kit *EnVision+ (System HRP Labelled Polymer anti-Rabbit, Dako)*. Trois nouveaux rinçages de 5 min au PBS sont réalisés et les coupes sont ensuite révélées pendant 5 min à température ambiante dans une solution de substrat chromogène DAB (*Liquid DAB+ ; Dako*). Après deux rinçages rapides à l'H₂O milliQ, les coupes sont contre-colorées par de l'Héματοxyline de Carazzi [Héματοxyline cristallisée *Merck 4202* 0,5 g ; Iodate de Potassium *Merck 5053* 0,1 g ; Sulfate potassique d'aluminium *Flucka 60060* 25 g ; glycérine *UCB 1384* 100 mL ; H₂O distillée 400 mL ; laissé murir deux mois à l'obscurité] pendant 30 sec. Après deux derniers rinçages successifs à l'H₂O milliQ, les coupes sont déshydratées par une série de trois bains d'éthanol de concentration progressive [70%, 95% puis 100% (v/v)] pour terminer dans deux bains successifs de xylène de 5 et 10 min. Pour finir, les coupes sont montées entre lame et lamelle avec le milieu de montage permanent *Coverquick 3000 (VWR Chemicals Prolabo)*.

III. Étude *in vivo* de l'influence de ZO-1 sur l'infiltrat inflammatoire dans les CBNPC humains

1. Cohorte tumorale

Les échantillons de tissus humains étudiés proviennent d'une cohorte de 42 patients atteints de carcinomes broncho-pulmonaires non à petites cellules obtenue à partir de la Collection de Ressources Biologiques (n°DC-2008-374) du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Reims. Ces tissus tumoraux sont issus de biopsie de résections tumorales bronchiques et proviennent de 21 adénocarcinomes (ADC) et de 21 carcinomes épidermoïdes (CE). Les tissus ont été classés selon leur stade histologique TNM défini par la classification de l'OMS de 2009 (**Tableau 16**). Cette étude a été approuvée par le Comité d'évaluation Institutionnel du CHU de Reims.

Stade TNM	ADC	CE	Total
IA	9	4	13
IB	6	3	9
IIA	3	5	8
IIB	0	3	3
IIIA	3	6	9
Total	21	21	42

Tableau 16 : Cohorte des 42 échantillons de patients atteints de CBNPC utilisée

2. Immunohistochimie manuelle

Les analyses immunohistochimiques sont réalisées sur des sections sériées de tumeurs pulmonaires non à petites cellules (CBNPC) incluses en paraffine. Les coupes sont déparaffinées dans deux bains successifs de xylène pendant 10 et 5 min, puis réhydratées dans une série de bains de 3 min dans des solutions d'éthanol de concentration dégressive [100%, 95% puis 70% (v/v)] pour terminer par trois bains rapides d'H₂O milliQ. Le démasquage des sites antigéniques est réalisé à 121°C en autoclave (*Prestige Medical, Servilab, France*)

Étude *in vivo* de l'influence de ZO-1 sur l'infiltrat inflammatoire dans les CBNPC humains

pendant 22 minutes à une pression de 1,4 bar dans les solutions *Target Retrieval 10X* (Dako, Carpinteria, CA, États-Unis) à pH 9,0 ou dans une solution de tampon *Citrate Based 100X* (*Vector Laboratories, Burlingame, CA, États-Unis*) à pH 6,0 en fonction des anticorps utilisés. Les lames sont refroidies pendant 20 min avant d'être rincées deux fois à l'H₂O milliQ. Le blocage des peroxydases endogènes est effectué par une incubation dans une solution *BLOXALL™ Blocking Solution* (*Vector Laboratories, Burlingame, CA, États-Unis*) pendant 10 min à température ambiante. Après deux nouveaux rinçages au PBS, la saturation des sites aspécifiques est maîtrisée par une solution de PBS/BSA 10% ou 3% (v/v) (*Sigma-Aldrich, St Louis, MO, États-Unis*) selon la poly- ou mono-clonalité respective de l'anticorps primaire utilisé. Les anticorps primaires dilués dans une solution de PBS/BSA 3% ou 1% (v/v) (*Sigma-Aldrich, St Louis, MO, États-Unis*) selon leur poly- ou mono-clonalité respective sont ensuite déposés sur les coupes et incubés pendant une nuit à 4°C. Les anticorps primaires anti-Foxp3, anti-N-élastase et anti-ZO-1 utilisés sont référencés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 17**).

Protéines	Espèces	Dilutions	Clones	Référence	Fournisseur
CD3	Humain	1/200 ^e	-	A0452	Dako
CD4	Humain	1/20 ^e	RBT-CD4	BSB5152	Diagomics
CD8	Humain	1/50 ^e	C8/144B	M7103	Dako
Foxp3	Humain	1/100 ^e	236A/E7	14-4777-82	eBioscience
N-élastase	Humain	1/1000 ^e	-	Ab68672	Abcam
PD-L1	Humain	1/50 ^e	22C3	M365329-2	Agilent Technologies
ZO-1	Souris	1/150 ^e	1A12	339100	Invitrogen

Tableau 17 : Liste des anticorps utilisés pour les IHC sur les coupes humaines CBNPC

Le lendemain, trois rinçages de 5 min sont effectués et les coupes sont ensuite incubées pendant 30 min à température ambiante dans une solution d'anticorps secondaire spécifique anti-souris ou anti-lapin du kit *ImmPRESS™ Reagent kit* (*Vector Laboratories, Burlingame, CA, États-Unis*). Trois nouveaux rinçages de 5 min au PBS sont réalisés et suivis d'une incubation avec la solution de substrat chromogène *ImmPACT NovaRED™* (*Vector Laboratories, Burlingame, CA, États-Unis*) pendant 5 min à température ambiante. Après deux rinçages rapides à l'H₂O milliQ, les coupes sont contre-colorées par de l'Hématoxyline de Carazzi

Étude *in vivo* de l'influence de ZO-1 sur l'infiltrat inflammatoire dans les CBNPC humains

[Hématoxyline cristallisée *Merck 4202* 0,5 g ; Iodate de Potassium *Merck 5053* 0,1 g ; Sulfate potassique d'aluminium *Flucka 60060* 25 g ; glycérine *UCB 1384* 100 mL ; H₂O distillée 400 mL ; laissé murir deux mois à l'obscurité] pendant 30 sec. Après deux derniers rinçages successifs à l'H₂O milliQ, les coupes sont déshydratées par une série de trois bains d'éthanol de concentration progressive [70%, 95% puis 100% (v/v)] pour terminer dans deux bains successifs de xylène de 5 et 10 min. Pour finir, les coupes sont montées entre lame et lamelle avec le milieu de montage permanent *VectaMount (Vector Laboratories)*.

3. Immunohistochimie standardisée à l'aide du Ventana

L'analyse immunohistochimique de la vimentine, de CD3, de CD4, de CD8 et de PD-L1 sur les coupes de tumeurs de patients CBNPC sont effectuées à l'aide de l'appareil *VENTANA BenchMark XT (Ventana Medical Systems, Roche, Oro Valley, Arizona, Etats-Unis)*. Chaque étape de la technique, du déparaffinage au montage des lames, est effectuée automatiquement et pilotée par le logiciel *Ventana Medical Systems, module BenchMark XT IHC/ISH (Ventana Medical Systems, Roche, Oro Valley, Arizona, Etats-Unis)*. Tous les réactifs utilisés, ainsi que les solutions d'anticorps anti-vimentine, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 et anti-PD-L1 sont répertoriés dans le tableau ci-dessus (**Tableau 17**) et l'ensemble de la méthode est effectuée selon les recommandations du fabricant. Après l'immunohistochimie, les lames sont déshydratées par une série de trois bains d'éthanol de concentration progressive [70%, 95% puis 100% (v/v)] pour terminer dans deux bains successifs de xylène de 5 et 10 min. Pour finir, les coupes sont montées entre lame et lamelle avec le milieu de montage permanent *VectaMount (Vector Laboratories)*.

4. Scoring des marquages

Les analyses des marquages immunohistochimiques ont été réalisées de façon indépendante par deux pathologistes ne connaissant pas les données cliniques relatives aux échantillons. Un avis consensus a été apporté lorsqu'un écart était diagnostiqué sur un cas, par un examen simultané dudit cas à l'aide d'un microscope à deux têtes.

Concernant ZO-1, l'étendue nucléaire du marquage a été classée en 6 catégories comme suit : 0 = absence de marquage ; 1 = densité de cellules tumorales positives < 10% ; 2 = densité de cellules tumorales positives 11-25% ; 3 = densité de cellules tumorales positives de 26-50%

Étude *in vivo* de l'influence de ZO-1 sur l'infiltrat inflammatoire dans les CBNPC humains

; 4 = densité de cellules tumorales positives de 51-75% ; 5 = densité de cellules tumorales positives > 75%. Les coupes de tissus tumoraux ont ensuite été classées comme étant soit 0-1 (faible expression nucléaire) soit 2-5 (forte expression nucléaire).

Concernant PD-L1, l'étendue du marquage a été classée en 6 catégories, équivalentes à celle utilisées pour ZO-1. Les coupes de tissus tumoraux ont alors été classées comme étant soit 0 (absence d'expression de PD-L1) soit 1-5 (expression de PD-L1).

Concernant CD3, CD8, N-élastase et Foxp3, l'étendue du marquage a été classée en 4 catégories comme suit 1 = densité de cellules positives < 10% ; 2 = densité de cellules positives 11-25% ; 3 = densité de cellules positives de 26-50% ; 4 = densité de cellules positives > 50%. Les coupes de tissus tumoraux ont ensuite été classées comme étant soit 1-2 (faible expression du marquage) ou 3-4 (forte expression du marquage).

Pour finir, concernant CD4, l'étendue du marquage a été classée en 4 catégories comme suit : 0 = absence de cellules positives ; 1 = faible densité de cellules positives ; 2 = densité modérée de cellules positives ; 3 = densité importante de cellules positives. Les coupes de tissus tumoraux ont alors été classées comme étant soit 0-1 (faible expression de CD4) ou 2-3 (forte expression de CD4).

L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'un microscope *Eclipse-Ci* (Nikon Instruments, Melville, NY, États-Unis) équipé d'une caméra couleur haute définition *DS-Fi2* (Nikon) et du logiciel *NIS-Elements D* (Nikon).

IV. Étude du rôle de ZO-1 dans la mise en place d'un microenvironnement tumoral

1. Analyse de l'expression cytokinique par *cytokine array*

1.1. Concentration des milieux conditionnés

Une fois les surnageants récupérés puis purifiés des débris cellulaires (section M&M I.6.2.1), les milieux conditionnés des cellules, transfectées soit par un modèle transitoire de surexpression de ZO-1, soit d'inhibition par siARN ZO-1 (section M&M - I.4), sont concentrés sur des colonnes Amicon® 3K (*Amicon Ultra-15 Centrifugal Filters, Merck*), contenant des pores de 3 kDa permettant d'éliminer toutes les molécules en dessous de ce poids moléculaire. Les milieux déposés sur cette colonne sont centrifugés selon les instructions précisées par le fournisseur de manière à obtenir une concentration finale huit fois plus concentrée (8X). Après centrifugation, un aliquot de 250 µL de chaque surnageant concentré est prélevé pour vérifier la concentration de l'IL-8. Les milieux conditionnés concentrés sont ensuite dosés selon les instructions du kit de dosage *DC™ Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, États-Unis)* (section M&M - I.6.1.1) puis conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

1.2. Analyse de l'expression de 102 cytokines par *cytokine array XL*

Le *cytokine array XL* est réalisé à partir de milieux conditionnés de cellules Beas-2B dont l'expression de ZO-1 est soit surexprimée, soit réprimée transitoirement (section M&M I.4) et selon les instructions du kit *Human XL Cytokine array Kit (R&D Systems, ARY022B)*. Comme précédemment, les milieux conditionnés concentrés puis dosés sont utilisés selon le même principe que celui détaillé dans la section M&M - I.7. L'analyse quantitative des signaux chimioluminescents obtenus en duplicat est réalisée à l'aide du logiciel *Multi-Gauge (Fujifilm)*. Les valeurs obtenues en duplicat par unité arbitraire de densité de pixel pour chaque facteur soluble étudié sont normalisées par rapport à la moyenne des valeurs obtenues pour les spots contrôles correspondants et au nombre de cellules.

2. Analyse de l'expression des gélatinases

La technique de zymographie permet de visualiser l'activité protéolytique des gélatinases sécrétées par les cellules dans leur milieu conditionné. Pour cela, les gélatinases sont séparées par électrophorèse sur un gel de gélatine, substrat des protéinases étudiées. Selon le même principe que celui du *western-blotting*, les gélatinases migrent en fonction de leur masse moléculaire.

Les milieux conditionnés purs sont additionnés de tampon Laemmli 5X (*Bio-Rad*) permettant leur analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% (v/v) (*Euromedex*) avec 1 mg/mL de gélatine (Sigma, St-Louis, MO, Etats-Unis). La migration des échantillons est réalisée dans un tampon de migration refroidit [Tris 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1% (p/v)] à 4°C pour un ampérage constant (10 mA pour le gel de concentration et 20 mA pour le gel de séparation) à l'aide du système *Mini-Protean®III* (*Bio-Rad*). Après environ une heure de migration, le gel est rincé dans un bain de Triton X-100 à 2% (v/v) sous agitation lente à température ambiante pendant 30 min afin d'éliminer le SDS restant qui pourrait inhiber l'activité enzymatique. Le gel est ensuite déposé dans un tampon d'incubation [Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 5 mM, Triton X-100 (v/v), pH 7,6] une nuit à 37°C. La coloration des protéines du gel au bleu de Coomassie [R250, 0,125% (p/v)] s'effectue pendant 30 min à température ambiante avec de l'acide acétique 10% (v/v) et du méthanol 20% (v/v). S'en suit une étape de décoloration dans laquelle le gel est placé dans des bains contenant l'acide acétique 10% (v/v) et du méthanol 40% (v/v). L'activité protéolytique des gélatinases est alors visualisée par l'apparition de bandes claires sur fond bleu correspondant à la protéolyse de la gélatine par les protéases. L'acquisition de l'image est obtenue à l'aide de l'imager *LAS-1000* (Fujifilm) et l'analyse quantitative des plages de protéolyse est réalisée à l'aide du logiciel *Multi-Gauge* (Fujifilm).

3. Analyse de l'expression protéique par *western-blot*

Les échantillons protéiques sont obtenus et préparés de la même manière que précédemment (section M&M - I.6.1.1). La quantité d'échantillons protéiques déposée varie entre 5 à 10 µg en fonction des protéines détectées et des lignées utilisées. Les étapes d'électrophorèse en gel de polyacrylamide 10% (v/v) (*Euromedex*) sont réalisées selon les mêmes modalités précédemment détaillées (section M&M - I.6.1.2). Les anticorps primaires utilisés et leurs dilutions associées sont référencés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 18**). L'anticorps primaire monoclonal de souris anti-GAPDH (*clone 6C5, Millipore*) sert de contrôle pour la quantité de protéines déposées.

Protéines	Espèces	Dilutions	Clones	Référence	Fournisseur
Cadhérine-E	Souris	1/2500 ^e	36	610181	<i>BD Biosciences</i>
Cadhérine-N	Souris	1/1000 ^e	3-B9		<i>Invitrogen</i>
GAPDH	Souris	1/75000 ^e	6C5	MAB374	<i>Millipore</i>
JAM-1	Souris	1/5000 ^e	-	612121	<i>BD Biosciences</i>
Occludine	Souris	1/1000 ^e	-	31-1500	<i>Invitrogen</i>
Vimentine	Souris	1/1000 ^e	V9	M0725	<i>Dakocytomation</i>
ZO-1	Souris	1/1000 ^e	1A12	339100	<i>Invitrogen</i>

Tableau 18 : Liste des anticorps utilisés en *western-blotting*

La révélation des membranes est réalisée à l'aide du kit *Enhanced Chemiluminescence (ECL prime, Pierce)* selon les instructions fournies et la chimioluminescence est détectée à l'aide de l'imager *Amersham AI600 (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare, Buckinghamshire, Royaume-Uni)*. L'analyse quantitative des signaux chimioluminescents obtenus est réalisée à l'aide du logiciel *Multi-Gauge (Fujifilm)*. Les valeurs obtenues par unité arbitraire de densité de pixel pour les protéines étudiées sont normalisées par rapport aux valeurs obtenues pour le gène de ménage GAPDH.

V. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en accord avec l'échantillonnage, la nature de l'expérimentation et son mode de représentation (moyenne, médiane et fois d'induction). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM.

La significativité des résultats exprimés en fois d'induction (RT-qPCR, western-blotting, ELISA, chambre de Boyden et chambre de chimiotaxie) a été déterminée par l'analyse du *one sample t*-test. Les fois d'induction sont déterminées par normalisation aux valeurs de chaque contrôle respectif.

La significativité de l'analyse de la densité de marquage (N-Elastase et CD3) réalisée sur les coupes d'éponge en oreille de souris a été évaluée par l'utilisation du test bilatéral non paramétrique de *Mann-Whitney*, à partir de 3 coupes par oreille, avec $n = 15$ souris. L'ensemble des valeurs mesurées ont été normalisées par rapport à la moyenne de chaque contrôle respectif.

Les paramètres mesurés lors des autres méthodes expérimentales ont été analysés à l'aide de tests paramétriques *T Student* ou non paramétriques de *Mann-Withney* en fonction du nombre d'échantillons analysés et des variables comparées.

Les analyses statistiques concernant la corrélation de la localisation nucléaire de ZO-1 et l'expression de CD3, CD4, CD8, N-Elastase, PD-L1 et Foxp3 ont été réalisées à l'aide du test du *Chi*² en se référant aux immunoscores établis.

Chaque résultat est représentatif d'au minimum trois expériences indépendantes. La significativité est représentée par * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

RÉSULTATS

I. ZO-1 cyto-nucléaire régule l'expression de la chimiokine IL-8 dans les cellules bronchiques invasives *in vitro*

1. La localisation cyto-nucléaire de ZO-1 corrèle au potentiel invasif des cellules bronchiques humaines *in vitro*

A ce jour, plusieurs études du laboratoire ont mis en évidence la relocalisation de ZO-1 sous-membranaire au cours du processus de TEM (Polette *et al.* 2007, Brysse *et al.* 2012, Lesage *et al.* 2017). Afin de déterminer si une corrélation existe entre les capacités invasives des cellules bronchiques et la délocalisation de ZO-1, nous avons examiné la localisation de l'expression de ZO-1 sur un panel de lignées bronchiques humaines de capacités invasives diverses (**Figure 21**).

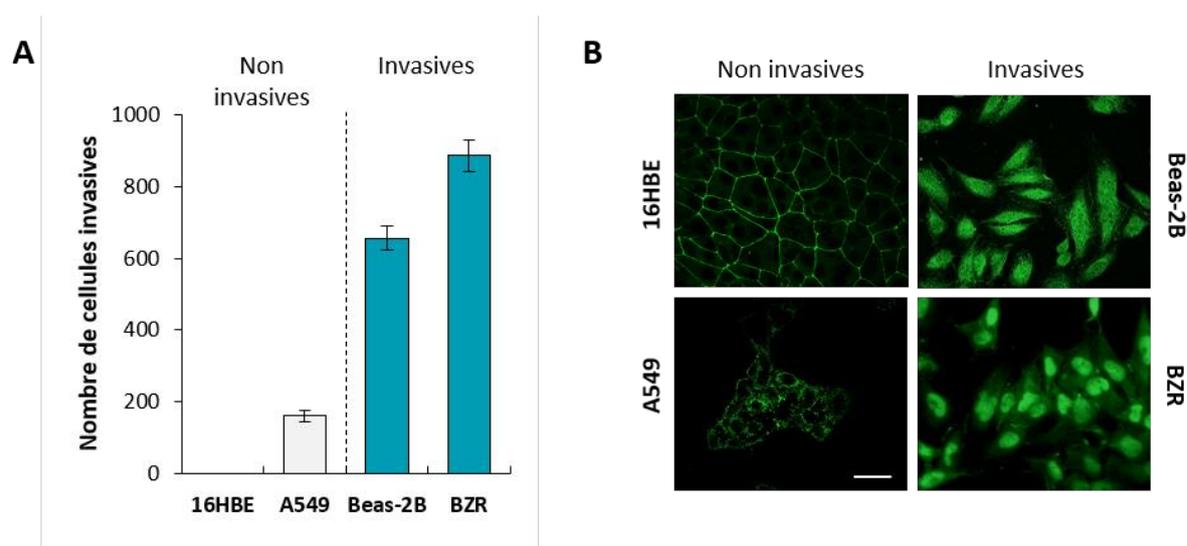


Figure 21 : Étude de la localisation de ZO-1 dans un panel de lignées bronchiques humaines

(A) Évaluation des capacités invasives des lignées pulmonaires 16HBE, A549, Beas-2B et BZR par des tests en chambre de Boyden modifiée. (B) Localisation de l'expression de ZO-1 dans les panels de lignées pulmonaires étudiée par immunofluorescence. Barre d'échelle = 30 μ m.

L'analyse par immunofluorescence révèle que ZO-1 est exprimé de façon membranaire dans les lignées bronchiques les moins invasives 16HBE et A549, sous une forme typique en « nid d'abeille » caractéristique de son implication dans les complexes jonctionnels épithéliaux (**Figure 21**). En revanche, dans les lignées bronchiques les plus invasives Beas-2B et BZR, présentant un phénotype de type mésenchymateux, l'expression de ZO-1 est

majoritairement cyto-nucléaire (**Figure 21**). L'expression de ZO-1 dans les compartiments cytoplasmique et nucléaire a d'ailleurs été validée dans les cellules invasives Beas-2B par microscopie confocale (**Figure 22**). Ainsi, nous confirmons donc la localisation cyto-nucléaire de ZO-1 dans les lignées pulmonaires invasives.

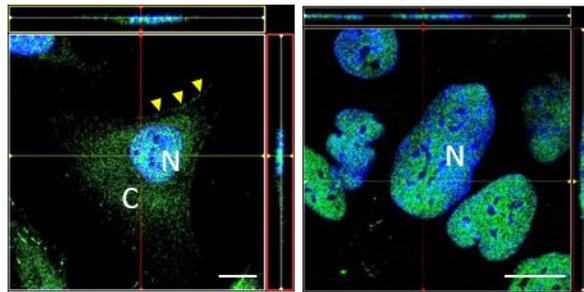


Figure 22 : Validation de la localisation cyto-nucléaire de ZO-1 dans la lignée invasive Beas-2B

Le profil d'expression cytoplasmique (C) et nucléaire (N) de ZO-1 a été caractérisé par microscopie confocale dans les cellules Beas-2B et des sections orthogonales des axes X et Y ont été réalisées (axe horizontal jaune, axe vertical rouge). Le marquage ZO-1 apparaît en vert et le marquage nucléaire au DAPI apparaît en bleu. Barres d'échelle = 10 μ m.

Par ailleurs, nous avons également révélé une expression ponctiforme de ZO-1 à la membrane des cellules Beas-2B (**Figure 22**). Cette expression membranaire est liée à la plasticité des cellules Beas-2B qui, à confluence, ont tendance à « s'épithélialiser » (**Figure 23**). *A contrario*, les cellules tumorales BZR invasives conservent leur morphologie fibroblastique à un même niveau de confluence (**Figure 23**).

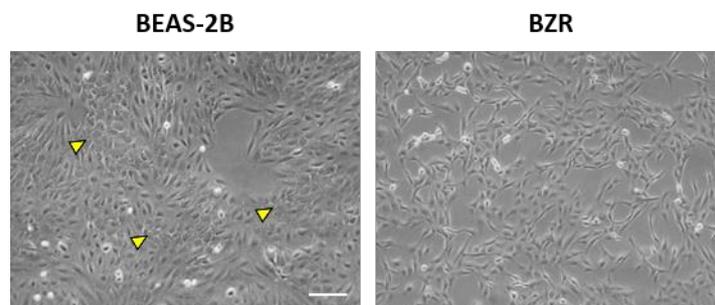


Figure 23 : Analyse de la plasticité des lignées invasives Beas-2B et BZR à confluence

Les images prises en contraste de phase au microscope montrent la morphologie des lignées invasives Beas-2B et BZR à confluence. Barre d'échelle = 50 μ m.

2. La TEM induit une relocalisation de ZO-1 dans les cellules bronchiques épithéliales *in vitro*

Par la suite, nous avons cherché à valider l'impact d'une TEM sur la délocalisation de ZO-1 dans la lignée bronchique épithéliale A549. Pour cela, les cellules d'adénocarcinome A549 ont été induites en TEM par un traitement au TGF- β pendant 48h (**Figure 24**). Dans ce modèle d'étude *in vitro* d'induction de TEM, le traitement au TGF- β provoque un changement de morphologie des cellules épithéliales A549 qui passent d'un phénotype « épithélialisé » vers un phénotype de type « mésenchymateux (**Figure 24**). De plus, le TGF- β diminue l'expression membranaire en « nid d'abeille » de ZO-1 en faveur d'une expression cyto-nucléaire dans les cellules A549 (**Figure 24**) (Lesage *et al.* 2017).

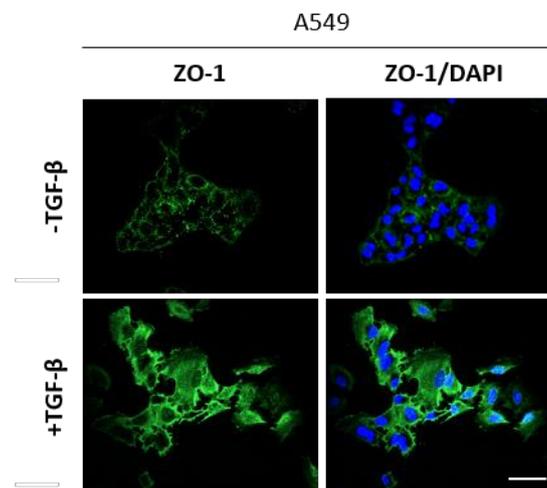


Figure 24 : Analyse de la délocalisation de ZO-1 dans les cellules A549 induites en TEM

Le profil d'expression de ZO-1 a été caractérisé par immunofluorescence dans les cellules A549 traitées ou non au TGF- β pendant 48h (\pm TGF- β). Le marquage ZO-1 apparaît en vert et le marquage nucléaire au DAPI apparaît en bleu. Barre d'échelle = 30 μ m.

3. La modulation de l'expression cyto-nucléaire de ZO-1 régule l'expression de la chimiokine IL-8 *in vitro*

La récente étude de Lesage *et al.* a établi un lien entre l'expression de ZO-1 et l'expression de la chimiokine IL-8. En effet, la surexpression de ZO-1 et l'inhibition de l'expression de ZO-1 dans les cellules bronchiques invasives Beas-2B induit respectivement une augmentation et une diminution de l'expression de l'IL-8 (Lesage *et al.* 2017). Ainsi, afin d'évaluer le rôle de l'IL-8 induit par ZO-1 dans la progression tumorale, nous avons reproduit ces expériences sur nos lignées pulmonaires invasives Beas-2B et tumorales BZR qui expriment ZO-1 de façon cyto-nucléaire. Pour cela, nous avons modulé l'expression de ZO-1, soit par un modèle de surexpression par transfection transitoire d'ADNc codant ZO-1, soit par un modèle d'inhibition à partir de siARN ciblant spécifiquement l'ARN de ZO-1. L'efficacité de chaque transfection transitoire a été vérifiée au niveau transcriptionnel et protéique par RT-qPCR et par western-blot respectivement (**Figure 25**).

Les analyses par immunofluorescence de la modulation d'expression de ZO-1 témoignent de la régulation du pool cyto-nucléaire de ZO-1 dans la lignée bronchique invasive Beas-2B. En effet, le pool cyto-nucléaire de ZO-1 est augmenté lorsque les cellules Beas-2B surexpriment ZO-1 et inversement (**Figure 25 A-B**).

Concernant la lignée tumorale BZR, l'inhibition de l'expression de ZO-1 dans ces cellules très invasives est efficace tandis que l'intégration du plasmide d'expression contenant l'ADNc de ZO-1 est plus difficile. En effet, l'expression protéique de ZO-1 étudiée par western blot révèle une diminution de son expression par les siARN ciblant ZO-1 mais son expression n'est pas augmentée par le plasmide ZO-1 (**Figure 25 D**). De même, l'analyse par immunofluorescence témoigne d'une diminution du pool cyto-nucléaire de ZO-1 par les siARN ciblant ZO-1 mais ne révèle aucune différence d'expression dans les cellules BZR transfectées avec le plasmide ZO-1 (**Figure 25 C**).

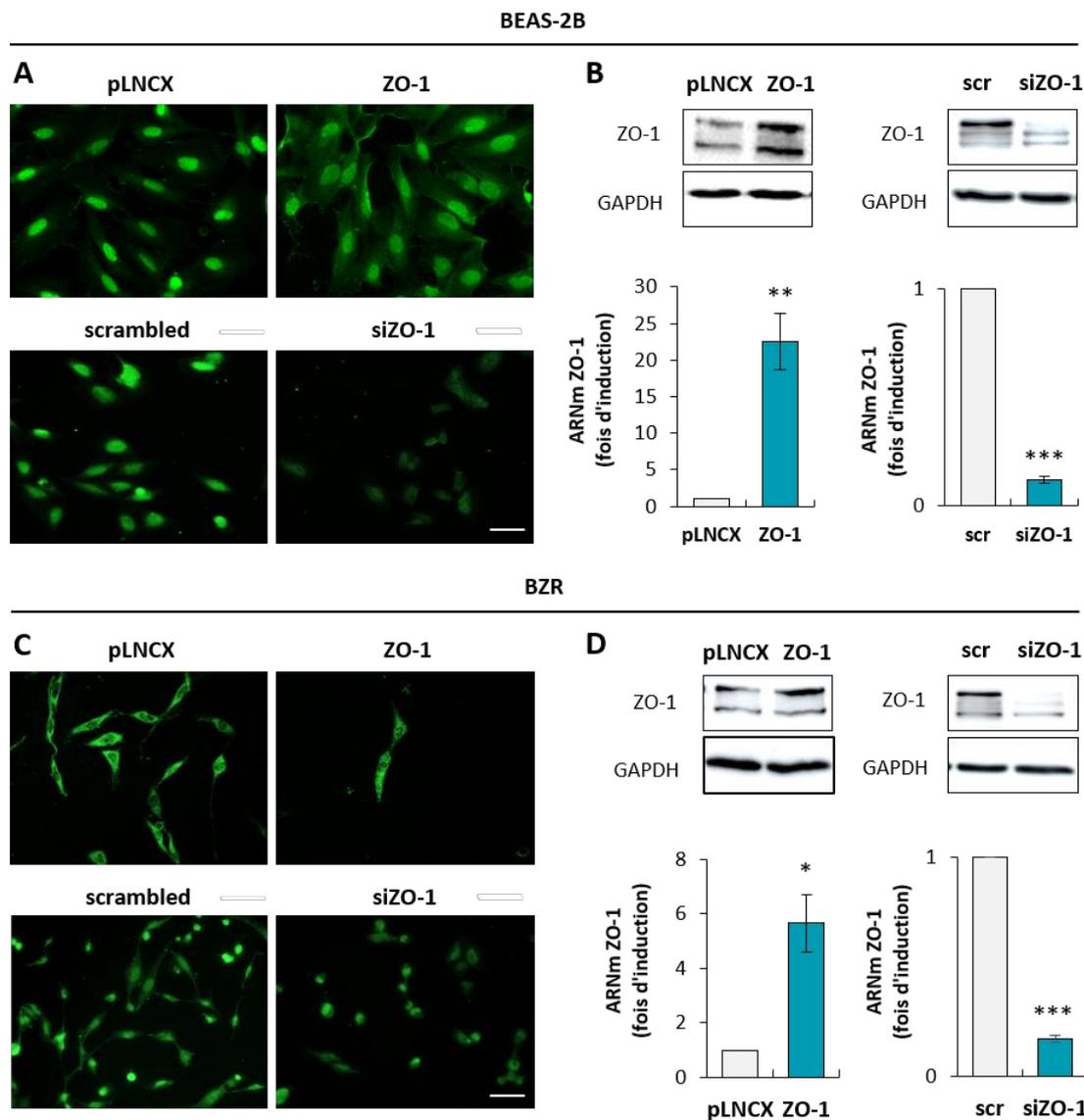


Figure 25 : Analyse de la modulation de l'expression de ZO-1 dans les cellules Beas-2B et BZR

(A-C) Le profil d'expression de ZO-1 a été caractérisé par immunofluorescence dans les cellules Beas-2B (A) et les cellules tumorales BZR (C) transfectées transitoirement soit avec l'ADNc codant ZO-1 (ZO-1) ou le vecteur vide (pLNCX) soit par siARN dirigé contre ZO-1 (siZO-1) ou la séquence scrambled correspondante (scr). Barres d'échelle = 30 μ m. (B-D) L'efficacité de chaque transfection transitoire des cellules Beas-2B (B) et BZR (D) a été contrôlée par évaluation des taux d'ARNm et protéique de ZO-1 par RT-qPCR et western-blotting respectivement. L'expression de la GAPDH sert de contrôle de dépôt. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 3$)

Par la suite, nous avons étudié l'expression de 36 cytokines humaines par *cytokine array* à partir de milieux conditionnés de cellules Beas-2B transfectées par siARN ciblant ZO-1. Nos données montrent une diminution majeure de la sécrétion de la chimiokine IL-8 lorsque l'expression de ZO-1 est inhibée dans les cellules Beas-2B (**Figure 26**).

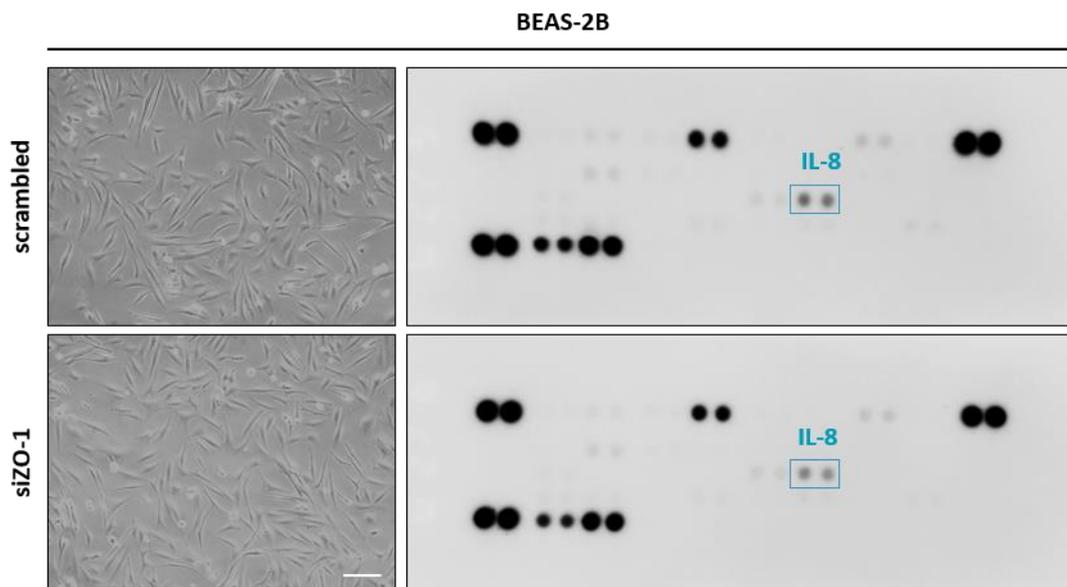


Figure 26 : Analyse de l'expression cytokinique des cellules Beas-2B par cytokine array

Les cellules Beas-2B ont été transfectées de façon transitoire par un modèle de siARN dirigé contre ZO-1 (siZO-1) ou la séquence scrambled correspondante (scr). Les images prises en contraste de phase au microscope montrent la morphologie de la lignée Beas-2B 48h post-transfection. Barre d'échelle = 50 μ m (**panel gauche**). Les surnageants de ces cellules ont été récupérés puis dosés purs en cytokine array afin d'évaluer l'expression de 36 cytokines humaines dans les deux conditions. Les encadrés bleus font référence aux spots dupliqués représentant l'expression de la chimiokine CXCL8/IL-8 (**panel droit**).

Nous avons d'ailleurs vérifié les résultats du *cytokine array* via des analyses menées par PCR quantitative et test ELISA (**Figure 27**). En effet, le taux d'expression de l'ARNm de l'IL-8 diminue respectivement de $0,15 \pm 0,07$ fois et $0,17 \pm 0,04$ fois dans les cellules Beas-2B et BZR qui présentent une inhibition d'expression de ZO-1 comparées aux cellules contrôles (**Figure 27 A-C**). Dans le même sens, l'expression protéique de l'IL-8 diminue de $0,25 \pm 0,12$ fois et $0,55 \pm 0,04$ fois respectivement dans les cellules Beas-2B et BZR siZO-1 en comparaison des cellules *scrambled* (**Figure 27 B-D**). *A contrario*, les niveaux d'expression transcriptionnelle et protéique de l'IL-8 sont augmentés respectivement de $2,62 \pm 0,20$ fois et $8,69 \pm 1,36$ fois dans les cellules Beas-2B qui surexpriment ZO-1 comparées aux cellules transfectées avec le

vecteur vide (**Figure 27 A-B**). En revanche, la lignée tumorale BZR surexprimant ZO-1 présente une faible augmentation significative des taux transcriptionnel et protéique de l'IL-8, à savoir $1,17 \pm 0,08$ fois et $1,25 \pm 0,14$ respectivement en comparaison aux cellules BZR contrôles (**Figure 27 C-D**).

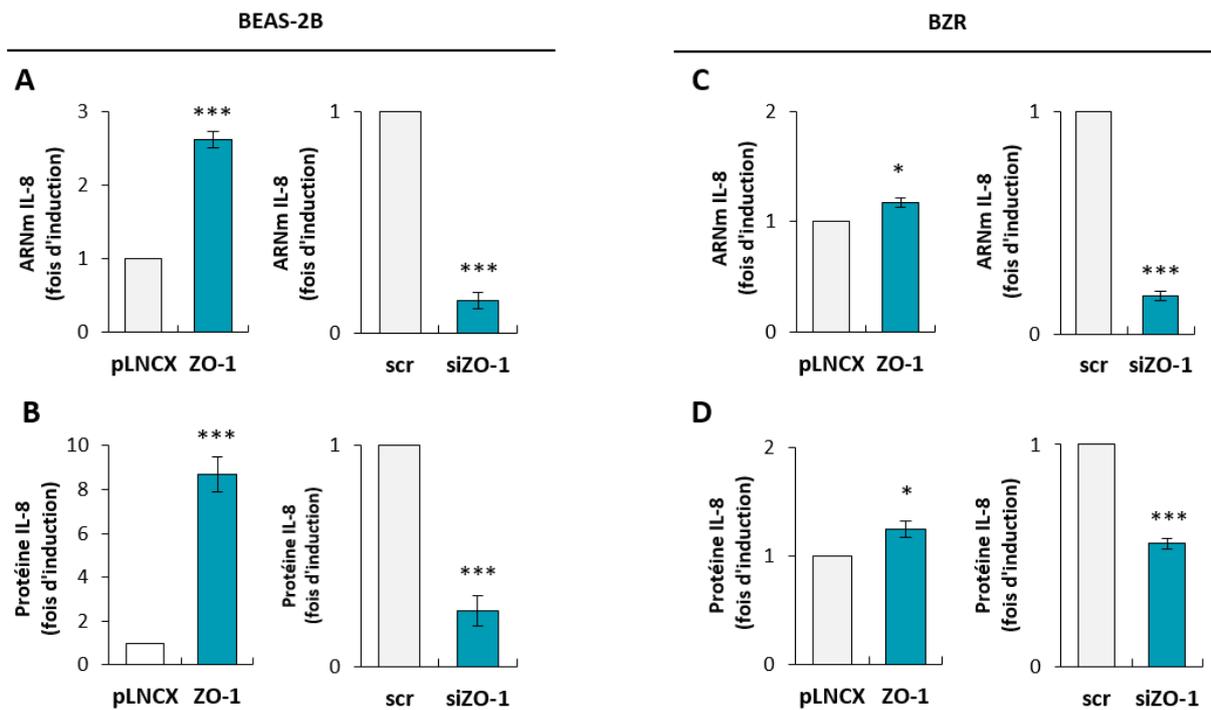


Figure 27 : Analyse de la modulation de l'expression de ZO-1 sur l'expression de l'IL-8 dans les lignées Beas-2B et BZR

Des transfections transitoires soit de l'ADNc codant ZO-1 (ZO-1) ou le vecteur vide (pLNCX), soit par siARN dirigé contre ZO-1 (siZO-1) ou la séquence scrambled correspondante (scr) ont été réalisées sur les cellules Beas-2B (**panel gauche**) et BZR (**panel droit**). L'expression de la chimiokine IL-8 a été analysée au niveau transcriptionnel par RT-qPCR (**A-C**) et protéique par ELISA (**B-D**). (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; $n = 3$)

Au total, l'ensemble de ces résultats confirme les données démontrées par la thèse du Docteur Julien Lesage et indiquent une modulation des taux d'expression de l'IL-8 dépendante de ZO-1 dans les cellules pulmonaires invasives. Le lien établi entre ZO-1 et l'IL-8, chimiokine connue majoritairement dans la littérature pour son rôle pro-inflammatoire, oriente alors nos recherches sur le recrutement d'un infiltrat inflammatoire.

II. La surexpression de ZO-1 favorise le recrutement de cellules inflammatoires *in vitro* et *in vivo*

1. ZO-1 favorise le recrutement monocyttaire *in vitro*

Afin de statuer sur le rôle fonctionnel de ZO-1 cyto-nucléaire vis-à-vis du recrutement des cellules inflammatoires, nous avons étudié l'influence de milieux conditionnés de cellules Beas-2B surexprimant ZO-1 sur le recrutement de la lignée monocyttaire THP-1 humaine *in vitro*. Nos résultats ont révélé une augmentation de $1,31 \pm 0,06$ fois du recrutement des cellules THP-1 avec les milieux conditionnés ZO-1, comparés aux milieux contrôles pLNCX (**Figure 28**). Ainsi, *in vitro*, ZO-1 est capable d'induire le recrutement de monocytes.

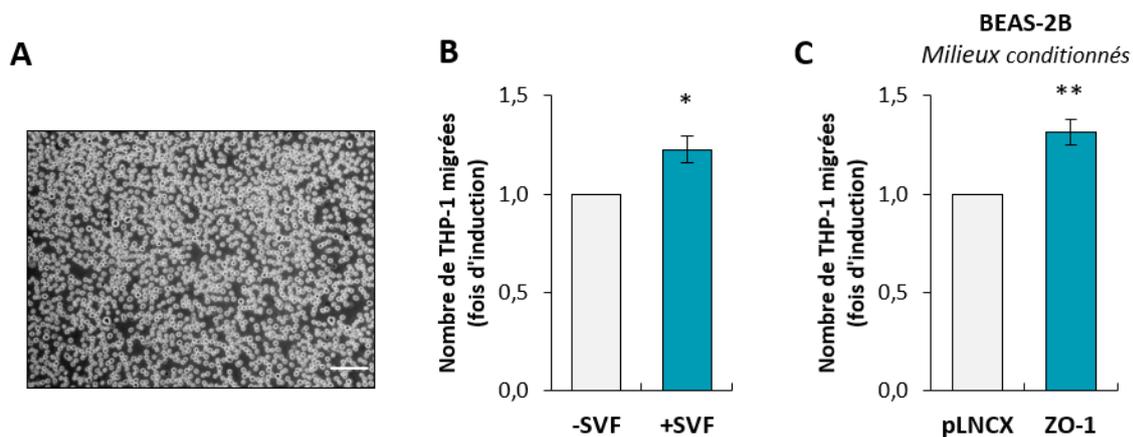


Figure 28 : Étude du pouvoir chimiotactique de ZO-1 dans les cellules Beas-2B *in vitro*

(A) La morphologie de la lignée monocyttaire humaine THP-1 en suspension est illustrée par une image en microscopie. Barre d'échelle = 50 μm . (B) Le chimiotactisme de la lignée monocyttaire THP-1 a été évalué en chambre de chimiotaxie à partir de milieux contrôles négatif (-SVF) et positif (+SVF) pendant 24h comme témoin contrôle. (C) Le rôle chimiotactique de ZO-1 dans les cellules Beas-2B a été évalué à partir de milieux conditionnés de cellules Beas-2B transfectées de façon transitoire avec un vecteur codant ZO-1 (ZO-1) ou le vecteur vide correspondant (pLNCX) pendant 24h. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $n = 3$)

2. Les cellules invasives surexprimant ZO-1 favorisent la mise en place d'un microenvironnement pro-inflammatoire *in vivo*

2.1. ZO-1 favorise le recrutement de cellules inflammatoires et immunitaires *in vivo* dans un modèle murin de *sponge assay*

Afin de poursuivre notre étude *in vivo*, nous avons utilisé les milieux conditionnés, décrits précédemment, dans un modèle particulier de *sponge assay* murin. Ainsi, des éponges chirurgicales imbibées de milieux conditionnés de cellules Beas-2B surexprimant ZO-1 ou non, sont implantées en sous-cutanée dans les oreilles de souris. Après 3 à 21 jours d'implantation, la densité de cellules recrutées au sein des éponges est quantifiée et caractérisée à l'aide de colorations, d'immunomarquages et de diverses techniques de quantification adaptées.

2.1.1. Comparaison des techniques de quantification cellulaire

Dans un premier temps, l'analyse du recrutement cellulaire au sein des éponges est réalisée à partir de coloration des noyaux cellulaires au DAPI et de leur quantification automatisée. Pour cela, notre laboratoire a développé une macro à partir de l'interface *ImageJ* permettant de quantifier le nombre de cellules recrutées par surface d'éponge en μm^2 (**Figure 29**).

Cette macro, utilisée pour les quantifications d'infiltrats cellulaires à 3 jours, s'est révélée non optimale pour les infiltrats de 21 jours, qui sont beaucoup plus nombreux. En effet, la densité cellulaire abondante à 21 jours empêche la dissociation des cellules les unes des autres par la macro. Afin de solutionner ce problème, nous avons développé une nouvelle macro à partir de l'interface MATLAB. Cette technique de quantification est basée sur la détection de l'aire occupée par les cellules par rapport à l'aire totale de l'éponge (**Figure 30**).

La comparaison de ces deux techniques de quantification sur des sections d'oreille de 3 jours a révélé les mêmes résultats. Ainsi, pour faciliter notre analyse globale, nos résultats de quantifications des noyaux cellulaires colorés au DAPI sont exploités en fonction de la densité de cellules recrutées au sein de l'éponge.

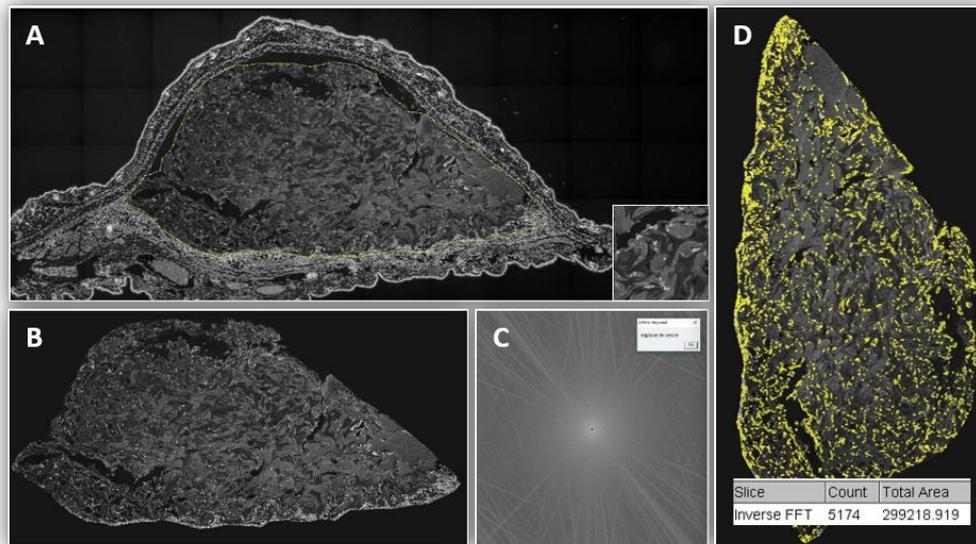


Figure 29 : Méthode de quantification automatique par nombre de cellules

(A) L'image virtuelle de l'oreille contenant l'éponge est exploitée en niveaux de gris. Le noyau des cellules marquées au DAPI apparaissent alors en blanc. A partir de cette image, la délimitation de l'éponge est définie manuellement. (bas droit) L'image zoomée permet de visualiser les cellules individualisées dans l'éponge. (B) L'image correspondant à la surface de l'éponge est rognée et exploitée à l'aide (C) d'une macro développée au sein de notre laboratoire à partir de l'algorithme de la transformation de Fourier (FFT). (D) Ainsi, la densité cellulaire est calculée à partir du nombre de cellules détectées rapporté à la surface de l'éponge en μm^2 .

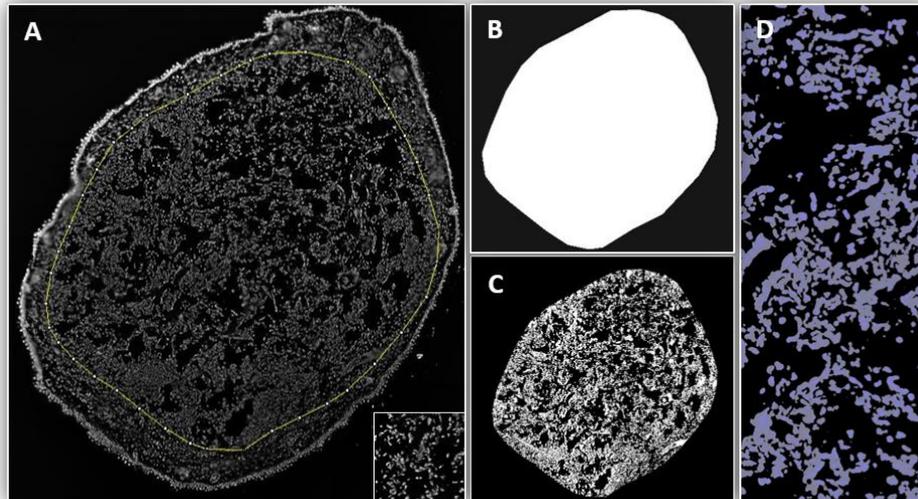


Figure 30 : Méthode de quantification automatique par densité de cellules marquées

(A) L'image virtuelle de l'oreille contenant l'éponge est exploitée en niveaux de gris. Le noyau des cellules marquées au DAPI apparaissent alors en blanc. A partir de cette image, la délimitation de l'éponge est définie manuellement. (bas droit) L'image zoomée permet de visualiser les amas de cellules dans l'éponge. (B-C) L'image correspondant à la surface de l'éponge est rognée : (B) la surface de l'éponge est définie à partir d'une image virtuelle dont l'aire totale de l'éponge est déterminée (C) et l'aire occupée par les cellules est déterminée à partir d'une image binarisée des cellules marquées au DAPI détectées (D) Pour finir, l'image binarisée générée en (C) est superposée à l'image de départ (A) afin de vérifier la bonne détection des cellules. Puis, la densité cellulaire est calculée en fonction de l'aire occupée par les cellules sur l'aire de l'éponge.

2.1.2. Méthode de quantification des cellules inflammatoires

Dans un second temps, l'analyse du recrutement de populations de cellules inflammatoires et immunitaires au sein des éponges et en périphérie des éponges est réalisée à partir d'immunomarquages anti-N-élastase et anti-CD3 pour détecter les neutrophiles et les lymphocytes T respectivement. Par la suite, nous avons développé une macro à partir de l'interface MATLAB, permettant de quantifier la densité de cellules immunomarquées recrutées au sein ou en périphérie de l'éponge (**Figures 31 & 32**).

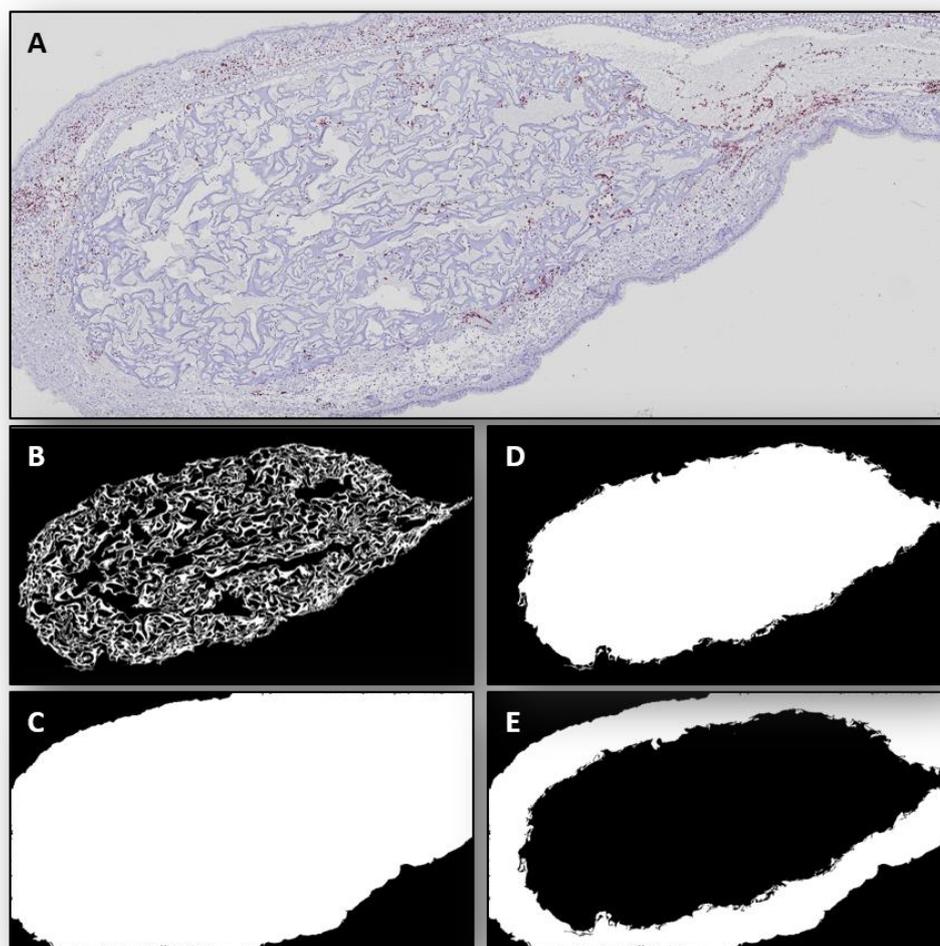


Figure 31 : Méthode de quantification automatique de la densité de cellules immunomarquées

(A) L'image virtuelle de l'oreille contenant l'éponge est exploitée en format RGB (red, green, blue). L'éponge apparaît en nuances de bleu et les cellules immuno-marquées apparaissent en rouge. (B) A partir de l'image originale (A), la détection de l'éponge est automatique. (C) Le masque représentant la surface totale de la coupe est défini par la détection de l'image originale complète. (D) Le masque de l'éponge établie en (C) est rempli par un filtre morphologique de « remplissage des trous » afin de déterminer la surface totale de l'éponge (E) Le masque représentant la surface totale de la périphérie de l'éponge est défini par la soustraction de l'image (D) à l'image (C).

Techniquement, les images des éponges sont enregistrées en format RGB (rouge, vert, bleu). Dans cette image, l'éponge apparaît en bleu et les cellules apparaissent en rouge. Pour chaque image, des filtres classiques et morphologiques sont appliqués dans le but d'éliminer le bruit de fond et d'augmenter le contraste entre les cellules et l'éponge. Ces images sont ensuite binarisées en utilisant une technique de seuillage établie par Kapur *et al.* en 1985 (Kapur, Sahoo, and Wong 1985). Par la suite, les différentes étapes utilisées sont décrites dans les figures 31 & 32 (**Figures 31 & 32**).

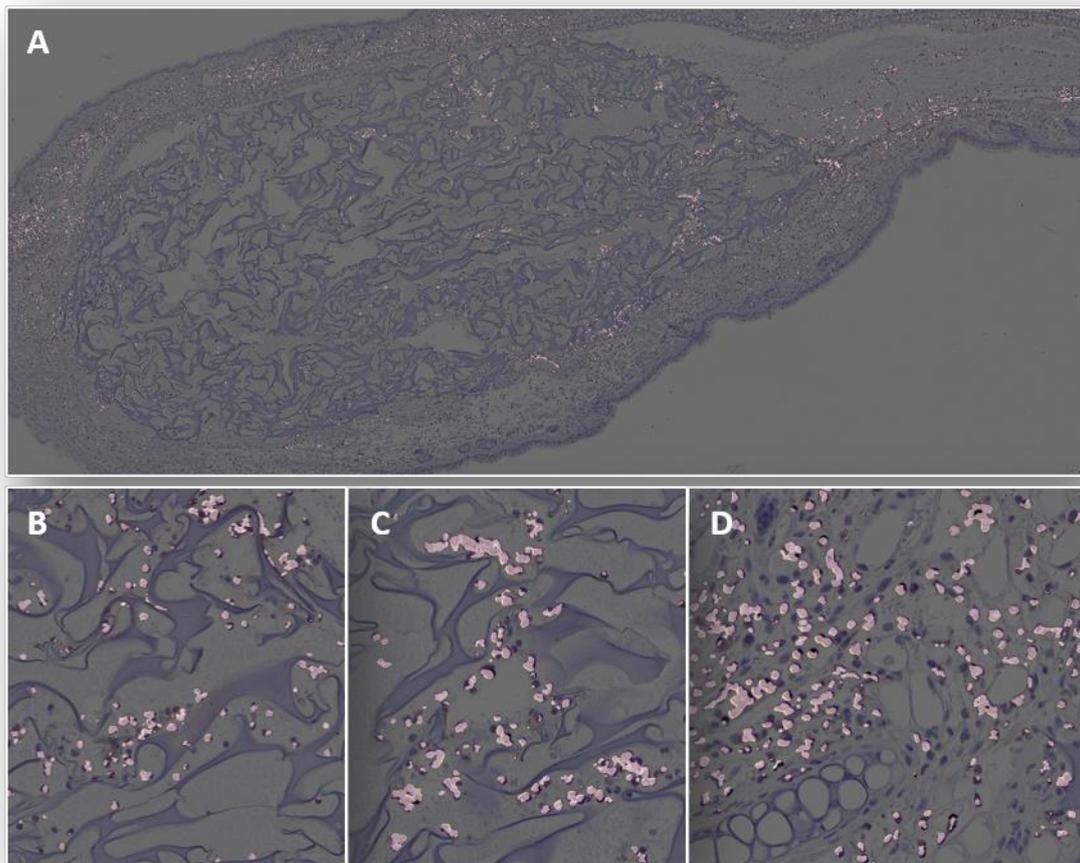


Figure 32 : Superposition des images binarisées de la densité de cellules immunomarquées

(A) L'image binarisée des cellules immuno-marquées détectées est superposée à l'image originale exploitée en format RGB (rouge, vert, bleu). Par transparence, les cellules immunomarquées détectées par la macro sont visibles en blanc sur des zooms (B-C) au sein de l'éponge et (D) en périphérie de l'éponge.

La densité des cellules immunomarquées est ensuite définie par le nombre de pixels déterminé à partir de l'ensemble des cellules (aire totale occupée par les cellules), divisé par le nombre de pixels déterminé à partir des masques associés (aire totale de la région considérée de l'éponge).

2.1.3. ZO-1 favorise le recrutement cellulaire à 3 et 21 jours

En condition de surexpression de ZO-1, l'analyse de la densité cellulaire recrutée au sein des éponges à 3 et 21 jours révèle une augmentation significative de l'infiltrat cellulaire dans les éponges imbibées de milieux conditionnés de cellules Beas-2B transfectées avec le vecteur ZO-1 par rapport aux contrôles. Ce recrutement est significativement plus important de $1,90 \pm 0,20$ fois à un temps précoce de 3 jours et de $1,35 \pm 0,07$ fois à un temps tardif de 21 jours (**Figure 33**).

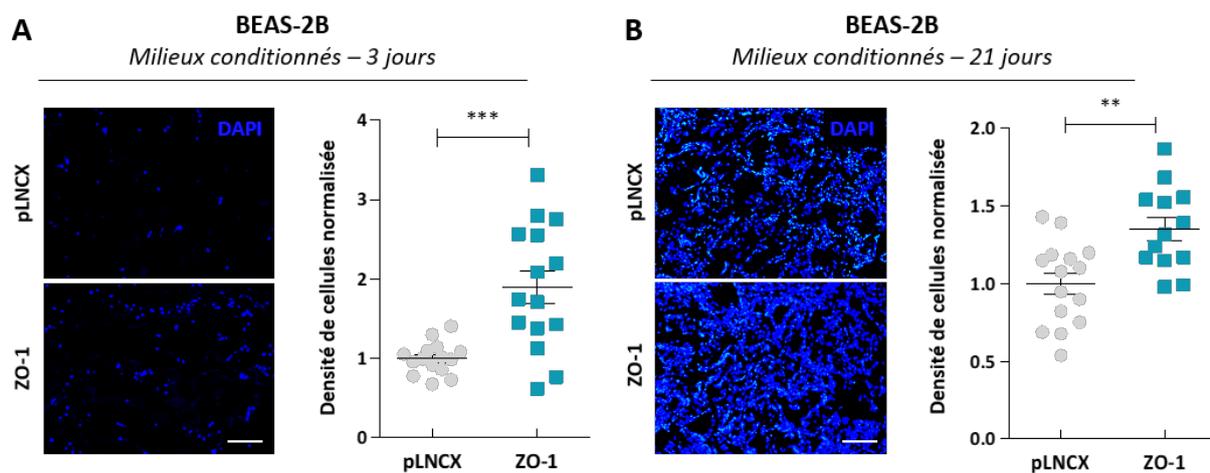


Figure 33 : Analyse de l'effet des milieux conditionnés de cellules Beas-2B surexprimant ZO-1 sur le recrutement cellulaire à 3 et 21 jours *in vivo*

Après (A) 3 à (B) 21 jours d'implantation des éponges imbibées de milieux conditionnés de cellules Beas-2B transfectées ou non avec le vecteur ZO-1, des sections de l'oreille sont réalisées et colorées au DAPI (**panel gauche**) afin de révéler les cellules présentes au sein de l'éponge. Barres d'échelle = 120 μm . (A – **panel droit**) A 3 jours et (B – **panel droit**) à 21 jours, la quantification de la densité cellulaire est analysée en fonction de la surface de marquage détectée par μm^2 d'éponge puis normalisée. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 15$)

Dans le but d'identifier et de différencier les populations de cellules inflammatoires recrutées au sein des éponges, nous avons réalisé des colorations au May Grünwald Giemsa (MGG). Ainsi, nous avons dénombré une majorité de granulocytes polynucléaires caractérisés par leurs noyaux polylobés (**Figure 34**).

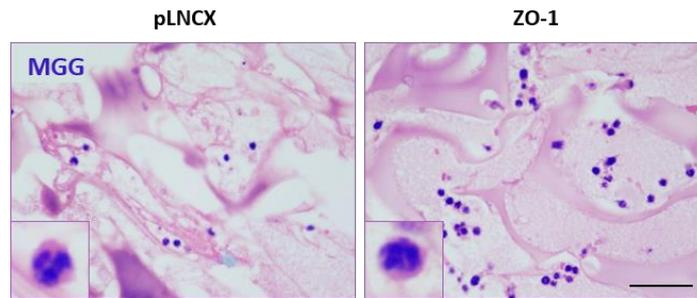


Figure 34 : Analyse des populations inflammatoires recrutées au sein des éponges à 3 jours

L'analyse par coloration au May-Grünwald-Giemsa (MGG) sur des sections d'oreille contenant les éponges imbibées de milieux conditionnés de cellules Beas-2B transfectées ou non avec le vecteur ZO-1 pendant 3 jours permet d'identifier les différentes populations inflammatoires recrutées au sein des éponges. Les images zoomées correspondent à des granulocytes polynucléaires caractérisés par leurs noyaux polylobés. Barre d'échelle = 100 μ m.

2.1.3.1. ZO-1 favorise un infiltrat inflammatoire à 3 jours *in vivo*

Afin de confirmer les résultats obtenus à partir des colorations au MGG des éponges à 3 jours, nous avons effectué des immunomarquages avec un anticorps anti-neutrophile élastase (N-élastase) ciblant spécifiquement les granulocytes polynucléaires neutrophiles. L'analyse quantitative des cellules immunomarquées N-élastase positives témoigne d'un recrutement significativement plus important de $1,76 \pm 0,19$ fois de neutrophiles au sein des éponges imbibées de milieux conditionnés de cellules surexprimant ZO-1 par rapport aux milieux conditionnés contrôles (**Figure 35 A-B**). Nous avons également observé la présence de neutrophiles en périphérie des éponges, sans différence significative entre nos deux conditions (**Figure 35 C**).

Ainsi, ces premiers résultats montrent la mise en place d'une réponse inflammatoire à 3 jours au sein des éponges. De ce fait, nous avons cherché à savoir si cette réponse inflammatoire précoce est capable d'entraîner une réponse immunitaire. Pour cela, nous avons réalisé des immunomarquages avec un anticorps anti-CD3 ciblant spécifiquement les lymphocytes T. Après 3 jours d'implantation, nous avons observé une concentration de lymphocytes T CD3 positifs majoritairement localisés en périphérie de l'éponge. Cependant, la quantité de lymphocytes T ne diffère pas en périphérie des éponges ZO-1 comparées à celle des éponges contrôles (**Figure 36 B-D**). De plus, une faible quantité de lymphocytes T est recrutée au sein de l'éponge dans laquelle nous observons une augmentation significative de cellules CD3 positives dans les éponges imbibées de milieux conditionnées ZO-1 comparées

aux contrôles (**Figure 36 A-C**). A noter que cette significativité n'est exprimée que sur une faible proportion de lymphocytes T détectés (1 à 5% de lymphocytes dans l'éponge).

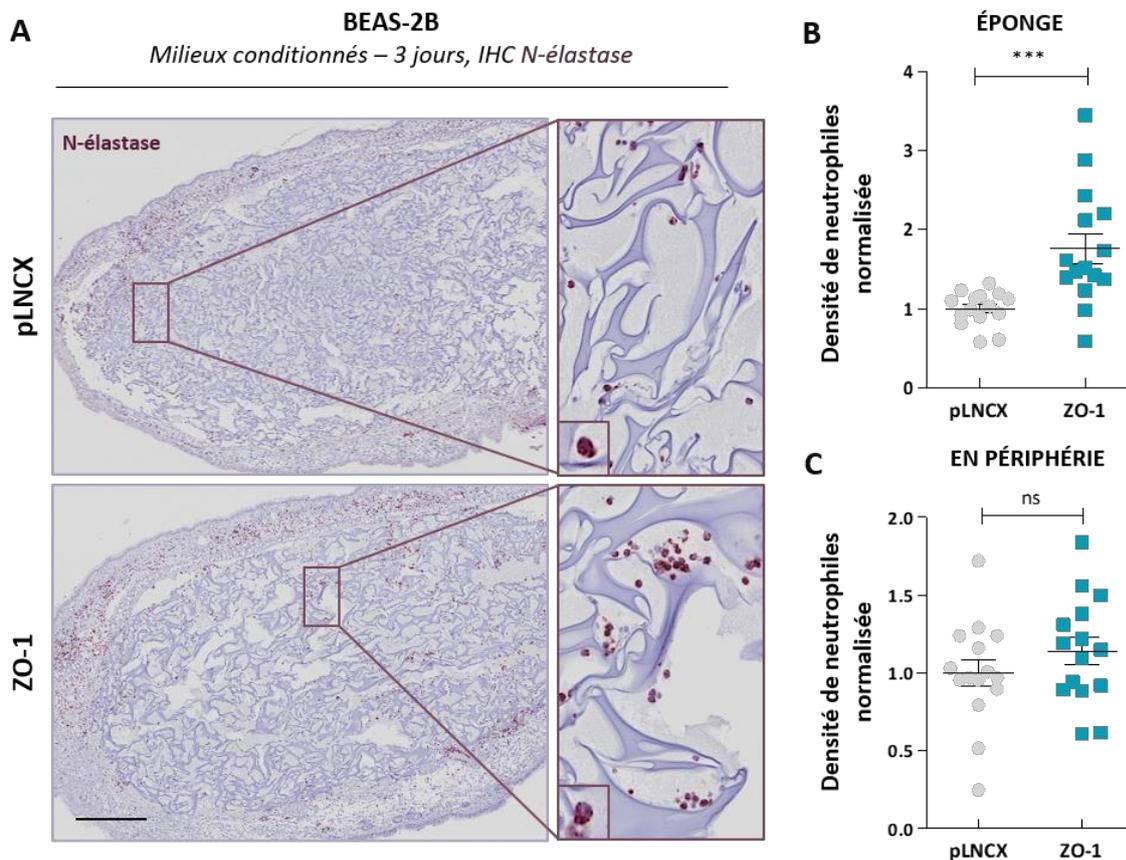


Figure 35 : Analyse de l'effet des milieux conditionnés de cellules Beas-2B surexprimant ZO-1 sur le recrutement de granulocytes polynucléaires neutrophiles à 3 jours *in vivo*

(A) L'analyse par immunohistochimie anti-neutrophile élastase (N-élastase) sur des sections d'oreille contenant les éponges imbibées de milieux conditionnés de cellules Beas-2B transfectées ou non avec le vecteur ZO-1 pendant 3 jours révèle spécifiquement les granulocytes polynucléaires neutrophiles. Barre d'échelle = 300 μ m. Les neutrophiles recrutés au sein des éponges sont mis en évidence par un marquage rougeâtre. (B-C) A 3 jours, les densités de neutrophiles recrutés (B) au sein de l'éponge et (C) en périphérie de l'éponge sont quantifiées par μ m² puis normalisées. (***) $p < 0,001$; $n = 15$)

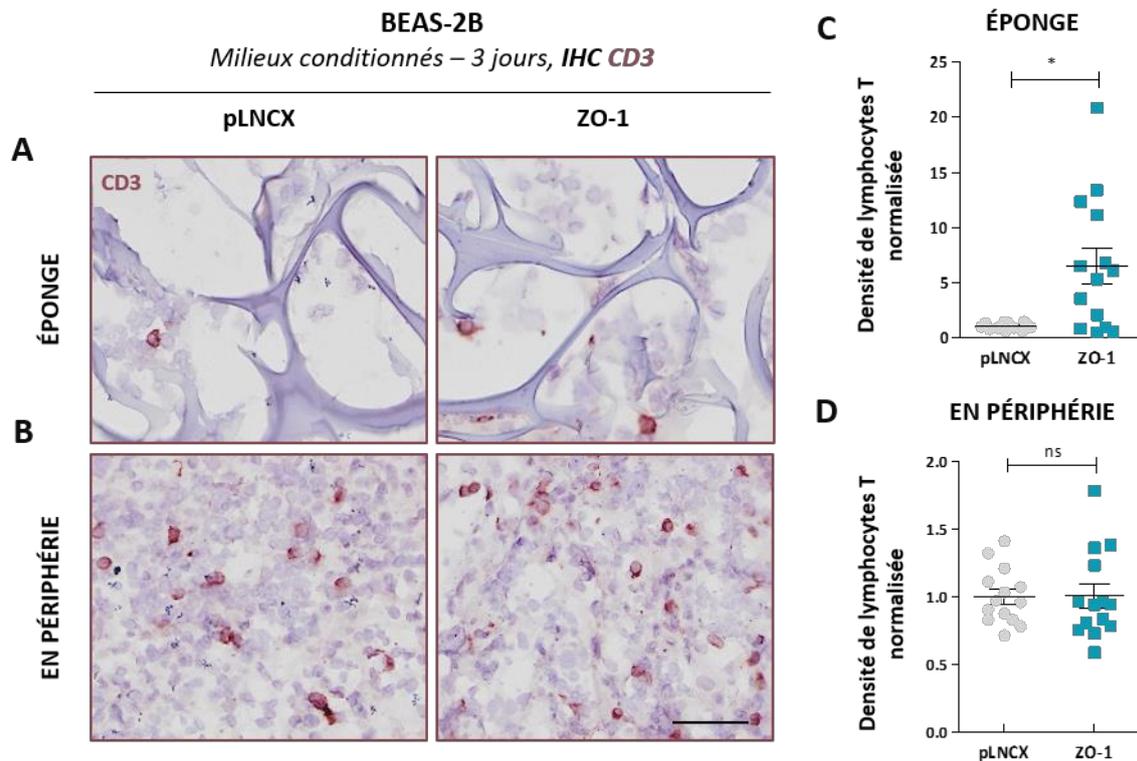


Figure 36 : Analyse de l'effet des milieux conditionnés de cellules Beas-2B surexprimant ZO-1 sur le recrutement de lymphocytes T à 3 jours *in vivo*

(A-B) L'analyse par immunohistochimie anti-CD3 sur des sections d'oreille contenant les éponges imbibées de milieux conditionnés de cellules Beas-2B transfectées ou non avec le vecteur ZO-1 pendant 3 jours révèle spécifiquement les lymphocytes T (A) au sein de l'éponge et (B) en périphérie de l'éponge grâce à un marquage membranaire rougeâtre. Barre d'échelle = 80 μm . (C-D) A 3 jours, les densités de lymphocytes T recrutés (C) au sein de l'éponge et (D) en périphérie de l'éponge sont quantifiées par μm^2 puis normalisées. (* $p < 0,05$; $n = 15$)

2.1.3.2. ZO-1 favorise un infiltrat immunitaire à 21 jours *in vivo*

Après 21 jours d'implantation des éponges, nous observons une persistance du milieu inflammatoire par le recrutement significativement plus important de $3,69 \pm 0,95$ fois de neutrophiles dans nos éponges imbibées de milieux conditionnés de cellules Beas-2B surexprimant ZO-1 comparées aux éponges contrôles (**Figure 37**). Ce microenvironnement inflammatoire chronique peut donc conduire au recrutement de cellules immunitaires défensives.

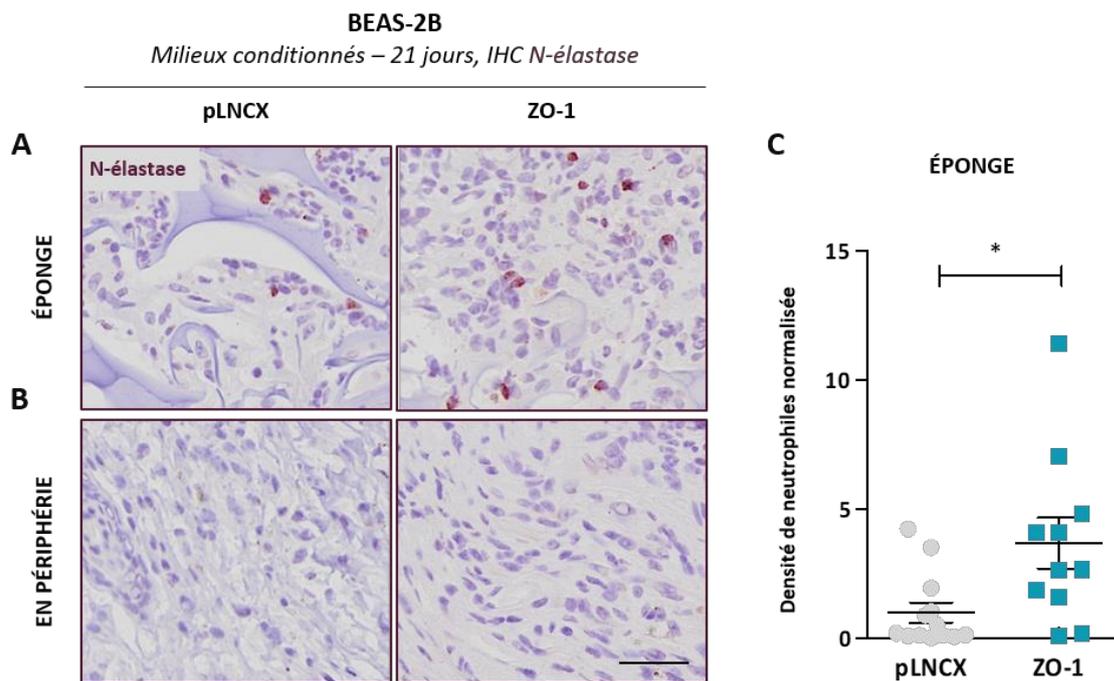


Figure 37 : Analyse de l'effet des milieux conditionnés de cellules Beas-2B surexprimant ZO-1 sur le recrutement de neutrophiles à 21 jours *in vivo*

(A-B) L'analyse par immunohistochimie anti-neutrophile élastase (N-élastase) sur des sections d'oreille contenant les éponges imbibées de milieux conditionnés de cellules Beas-2B transfectées ou non avec le plasmide ZO-1 pendant 21 jours révèle spécifiquement les neutrophiles (A) au sein de l'éponge et (B) en périphérie de l'éponge grâce à un marquage rougeâtre. Barre d'échelle = 80 μm . (C) A 21 jours, la densité de neutrophiles recrutés au sein de l'éponge est quantifiée par μm^2 puis normalisée. (* $p < 0,05$; $n = 15$)

Dans ce contexte, nous avons étudié le recrutement de lymphocytes T au sein des éponges, après 21 jours d'implantation des éponges. L'analyse des immunomarquages anti-CD3 révèle une augmentation significative de $1,46 \pm 0,17$ fois du recrutement de lymphocytes T CD3 positifs au sein des éponges ZO-1 par rapport aux éponges contrôles (**Figure 38**).

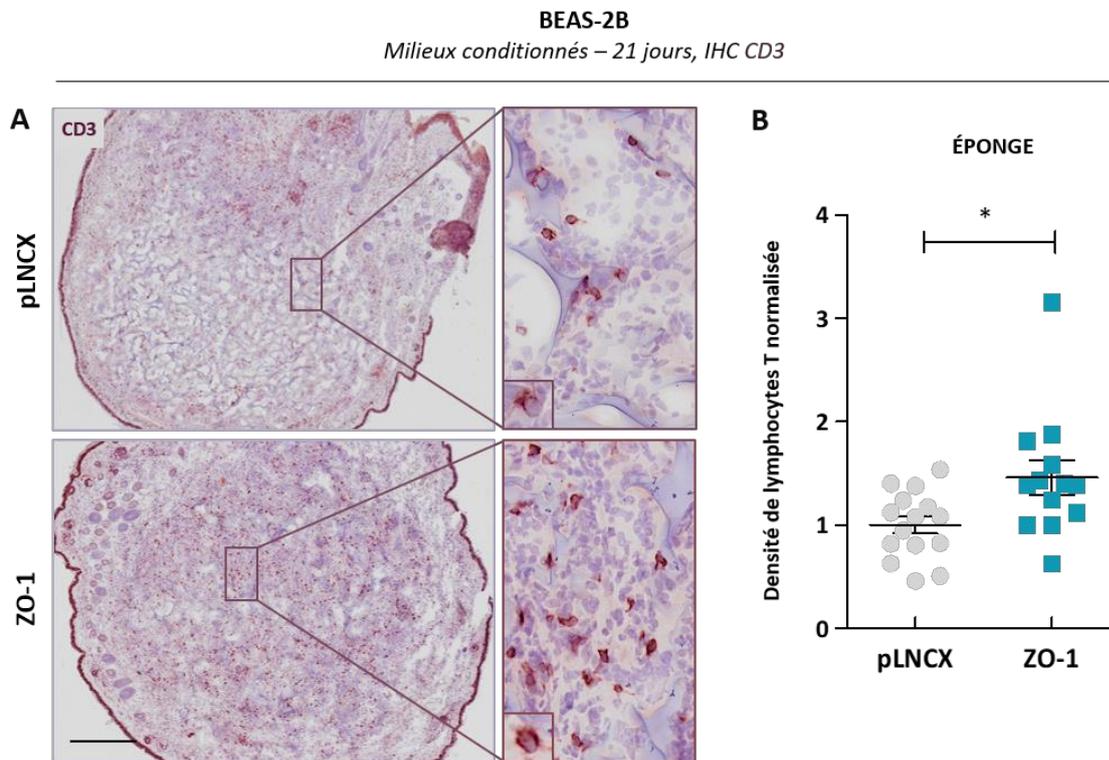


Figure 38 : Analyse de l'effet des milieux conditionnés de cellules Beas-2B surexprimant ZO-1 sur le recrutement de lymphocytes T à 21 jours *in vivo*

(A) L'analyse par immunohistochimie anti-CD3 sur des sections d'oreille contenant les éponges imbibées de milieux conditionnés de cellules Beas-2B transfectées ou non avec le vecteur ZO-1 pendant 21 jours révèle spécifiquement les lymphocytes T. Barre d'échelle = 300 μ m. Les lymphocytes T recrutés au sein des éponges sont mis en évidence par un marquage rougeâtre. (B) A 21 jours, la densité de lymphocytes T recrutés au sein de l'éponge est quantifiée par μ m² puis normalisée. (* $p < 0,05$; $n = 15$)

Ainsi, ces nouveaux résultats montrent la mise en place d'une réponse immunitaire à 21 jours au sein des éponges.

2.2. ZO-1 favorise le recrutement de cellules inflammatoires et immunitaires *in vivo* dans un modèle murin de *métastase*

Afin d'approfondir l'étude du rôle pro-inflammatoire de ZO-1, et de confirmer les résultats obtenus par les expérimentations de *sponge assay*, nous avons utilisé un modèle de métastases qui consiste à injecter directement, cette fois-ci, des cellules Beas-2B surexprimant ZO-1, dans la veine caudale des souris. Ainsi, le tropisme pulmonaire associé à la lignée invasive Beas-2B permet la caractérisation d'un infiltrat inflammatoire mis en place au niveau du poumon dès les premières 24h post-injection. Pour cela, nous avons réalisé une isolation des cellules hématopoïétiques CD45+ par un système de billes magnétiques au niveau d'un broyat pulmonaire établi 24h après l'injection de cellules Beas-2B transfectées ou non avec un vecteur codant ZO-1 de façon transitoire. Par la suite, l'infiltrat inflammatoire pulmonaire CD45+ est caractérisé par la technique de cytométrie en flux à l'aide d'un panel d'anticorps spécifiques de diverses populations inflammatoires.

Nos résultats ont d'ailleurs révélé un recrutement significativement plus important de $1,5 \pm 0,2$ fois de lymphocytes T dont $1,6 \pm 0,2$ fois de lymphocytes T helper, $1,6 \pm 0,1$ fois de lymphocytes T cytotoxiques et $1,4 \pm 0,1$ fois de *Natural Killer* T en condition ZO-1 par rapport à la condition contrôle pLNCX (**Figure 39**). De plus, nous avons observé une augmentation significative de la quantité de macrophages interstitiels recrutés de $2,1 \pm 0,3$ fois et une diminution significative du recrutement de cellules dendritiques de $0,8 \pm 0,1$ fois dans les poumons des souris injectées avec des cellules Beas-2B surexprimant ZO-1 comparées aux contrôles (**Figure 39**).

Ces résultats complètent et confirment les données *in vivo* précédentes, obtenues à partir du modèle de *sponge assay*. Ensemble, elles suggèrent un rôle pro-inflammatoire et/ou pro-immunitaire de ZO-1.

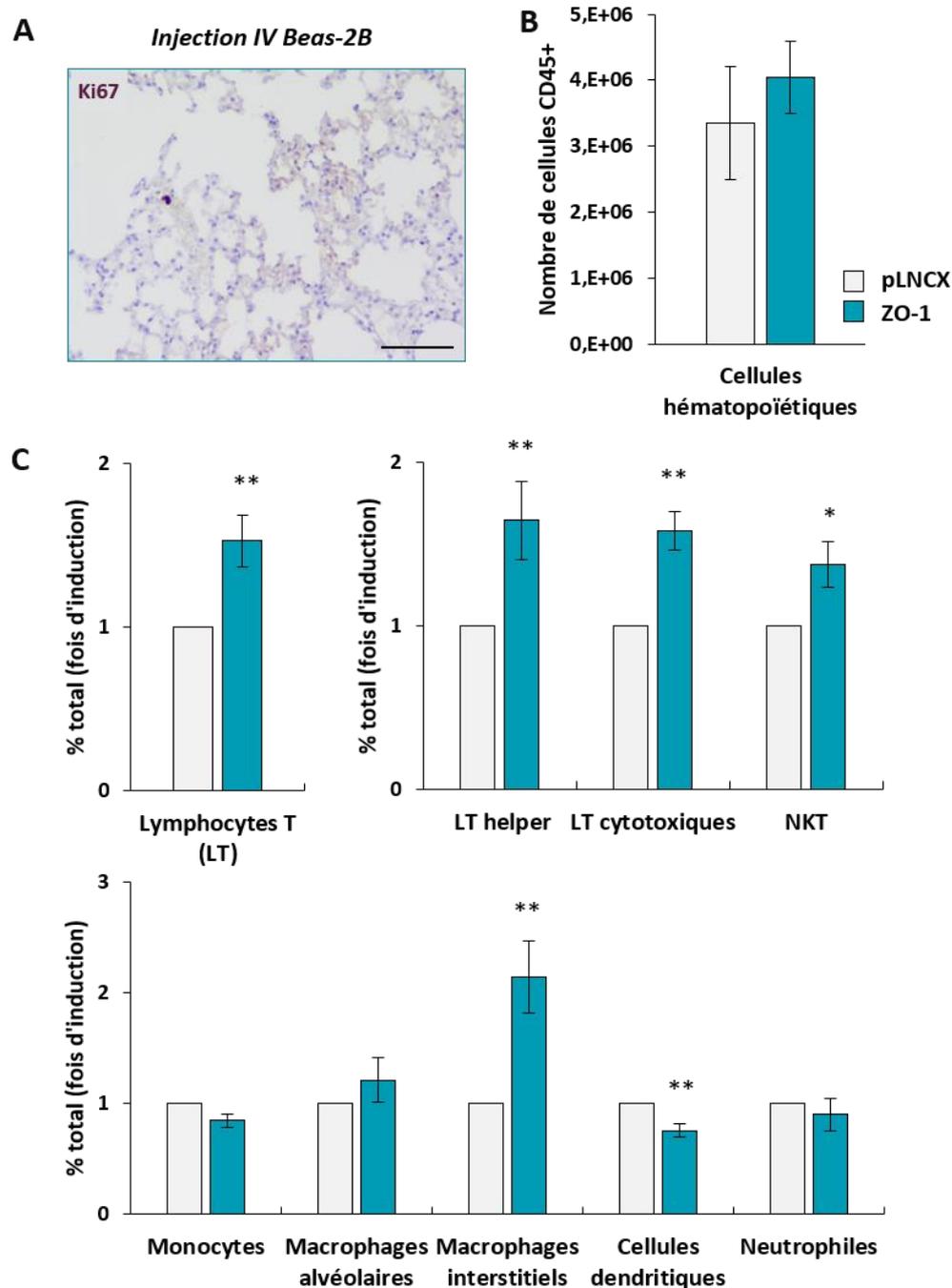


Figure 39 : Analyse de l'effet de l'injection en IV de cellules Beas-2B surexprimant ZO-1 sur le recrutement de cellules inflammatoires au niveau pulmonaire *in vivo*

(A) L'analyse par immunohistochimie anti-Ki67 humaine permet de valider la présence de cellules Beas-2B au niveau pulmonaire, 24h post-injection en veine caudale (IV). Barre d'échelle = 80 μ m. (B) Le nombre de cellules hématopoïétiques CD45+ isolées, par la technique d'isolation par billes magnétiques CD45, est déterminé avant le passage au FACS. (C) L'analyse des différentes populations inflammatoires recrutées au niveau du poumon, 24h post-injection IV est réalisée au FACS et les résultats sont présentés en fois d'induction en fonction du pourcentage de cellules recrutées par rapport au pourcentage de cellules totales. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $n = 10$)

III. L'inhibition de ZO-1 influence le recrutement de cellules inflammatoires

Après avoir démontré le rôle pro-inflammatoire induit par la surexpression de ZO-1 cytonucléaire dans les lignées invasives pulmonaires, nous avons étudié l'influence de l'inhibition de l'expression de ZO-1 dans les lignées invasives Beas-2B et BZR sur le recrutement des cellules inflammatoires. Pour cela, nous avons étudié l'influence de milieux conditionnés de cellules Beas-2B et BZR transfectées transitoirement par un modèle de siARN inhibant spécifiquement l'expression endogène de ZO-1, sur le recrutement de la lignée monocyttaire THP-1 humaine *in vitro*. Nos résultats n'ont révélé aucune différence significative du recrutement des cellules THP-1 avec les milieux conditionnés siZO-1, comparés aux milieux contrôles scr (**Figure 40**). Ainsi, en opposition avec les résultats obtenus précédemment lors de la surexpression de ZO-1 (**Figure 28**), à court terme, l'inhibition de ZO-1 dans les lignées Beas-2B et BZR n'a pas d'influence sur le recrutement de monocytes *in vitro*.

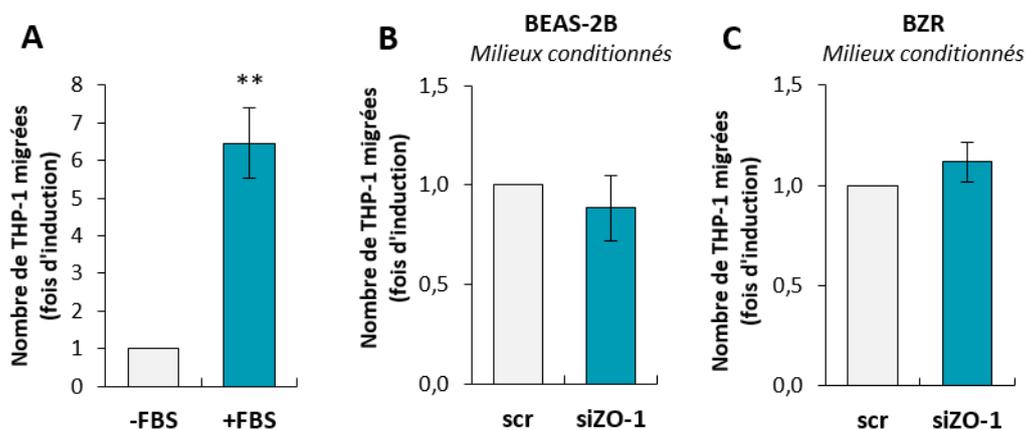


Figure 40 : Étude du pouvoir chimiotactique des cellules Beas-2B et BZR siZO-1 *in vitro*

(A) Le chimiotactisme de la lignée monocyttaire THP-1 a été évalué en chambre de chimiotaxie à partir de milieux contrôles négatif (-SVF) et positif (+SVF) pendant 7h. (B-C) Le rôle chimiotactique de ZO-1 dans les cellules Beas-2B (B) et BZR (C) a été évalué à partir de milieux conditionnés de cellules Beas-2B et BZR transfectées de façon transitoire par un modèle de siARN dirigé contre ZO-1 (siZO-1) ou la séquence scrambled correspondante (scr) pendant 7h. (** $p < 0,01$; $n = 3$)

Afin de valider nos résultats *in vitro*, nous avons analysé, *in vivo*, l'influence des milieux conditionnés de cellules Beas-2B et BZR présentant une diminution d'expression de ZO-1 sur le recrutement cellulaire à partir du modèle de *sponge assay* utilisé précédemment. Cette fois-ci, la densité cellulaire recrutée au sein des éponges est analysée à 6 et 21 jours. En effet, nous avons observé un faible recrutement cellulaire dans les éponges contrôles (scr) à 3 jours. Afin d'augmenter le recrutement basal de cellules, et ainsi, visualiser une potentielle différence entre nos deux conditions, nous avons implanté nos éponges 3 jours supplémentaires. Nos analyses ne révèlent aucune différence significative du recrutement cellulaire au sein des éponges à 6 jours que ce soit à partir des milieux conditionnés des cellules Beas-2B que des cellules BZR (**Figure 41 A-C**). En revanche, à plus long terme, nous observons une diminution significative de $0,70 \pm 0,10$ fois de l'infiltrat cellulaire dans les éponges implantées 21 jours et imbibées de milieux conditionnés de cellules Beas-2B transfectées avec des siARN dirigé contre ZO-1 par rapport aux contrôles (**Figure 41 B**). Par ailleurs, nous n'avons observé aucune différence significative à partir des milieux conditionnés de cellules BZR malgré une légère tendance observée (**Figure 41 D**).

De plus, à partir de notre modèle de métastases pulmonaires, nous n'avons détecté aucune différence significative de recrutement de cellules inflammatoires au niveau des poumons de souris injectées en IV par des cellules Beas-2B transfectées par siARN ciblant ZO-1 (**Figure 42**).

Ainsi, nos résultats obtenus suite à l'inhibition de l'expression de ZO-1 sont en opposition avec les résultats de surexpression de ZO-1 obtenus précédemment. L'ensemble de nos résultats *in vitro* et *in vivo*, suggère donc l'implication de deux mécanismes différents en fonction de la modulation de l'expression de ZO-1 dans les cellules pulmonaires invasives.

L'inhibition de ZO-1 influence différemment le recrutement de cellules inflammatoires

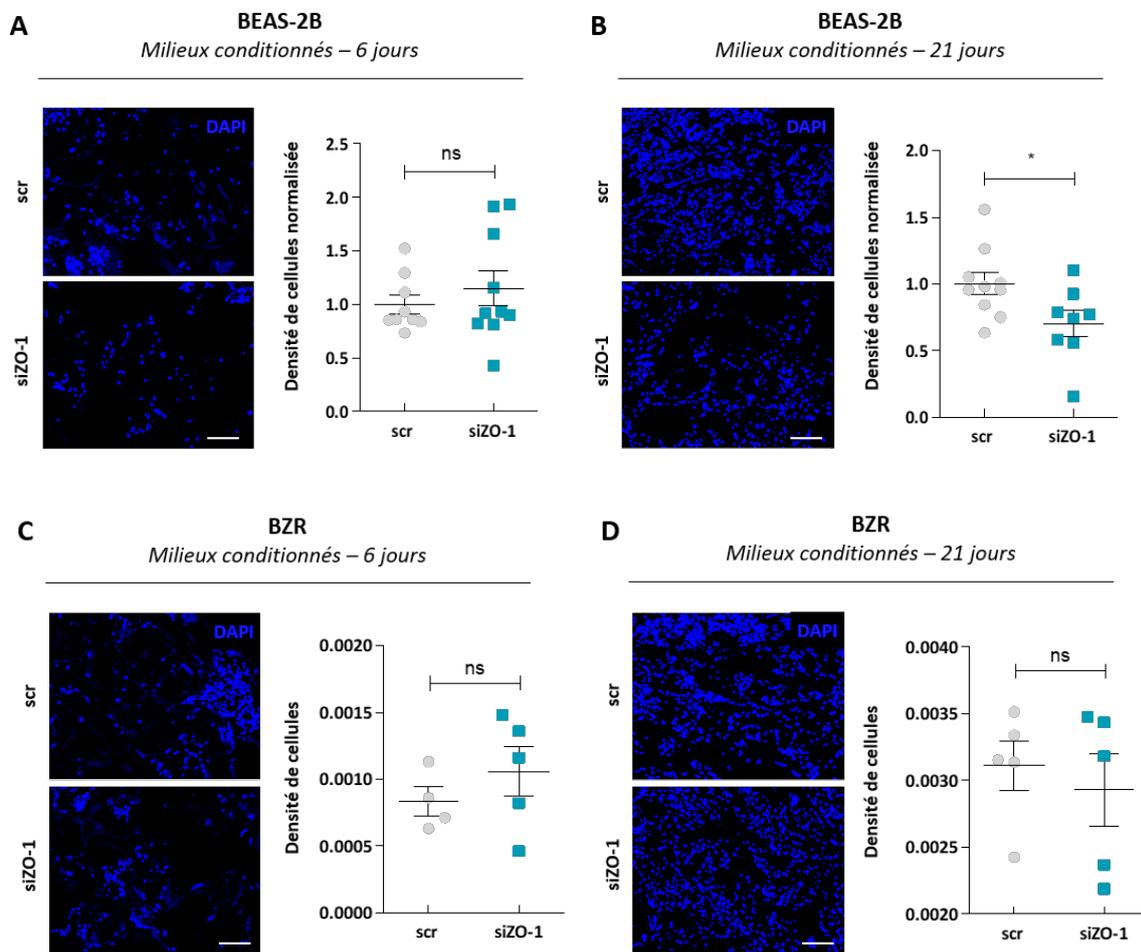


Figure 41 : Analyse de l'effet des milieux conditionnés de cellules Beas-2B et BZR dont l'expression de ZO-1 est inhibée sur le recrutement cellulaire à 6 et 21 jours *in vivo*

Après (A-C) 6 à (B-D) 21 jours d'implantation des éponges imbibées de milieux conditionnés de cellules (A-B) Beas-2B (n = 10) et (C-D) BZR (n = 5) transfectées ou non avec des siARN ciblant spécifiquement ZO-1, des sections de l'oreille sont réalisées et colorées au DAPI (**panel gauche**) afin de révéler les cellules recrutées au sein de l'éponge. Barres d'échelle = 120 μ m. (A-C – **panel droit**) A 6 jours et (B-D – **panel droit**) à 21 jours, la quantification de la densité cellulaire est analysée en fonction de la surface de marquage détectée par μ m² d'éponge puis normalisée (*p < 0,05)

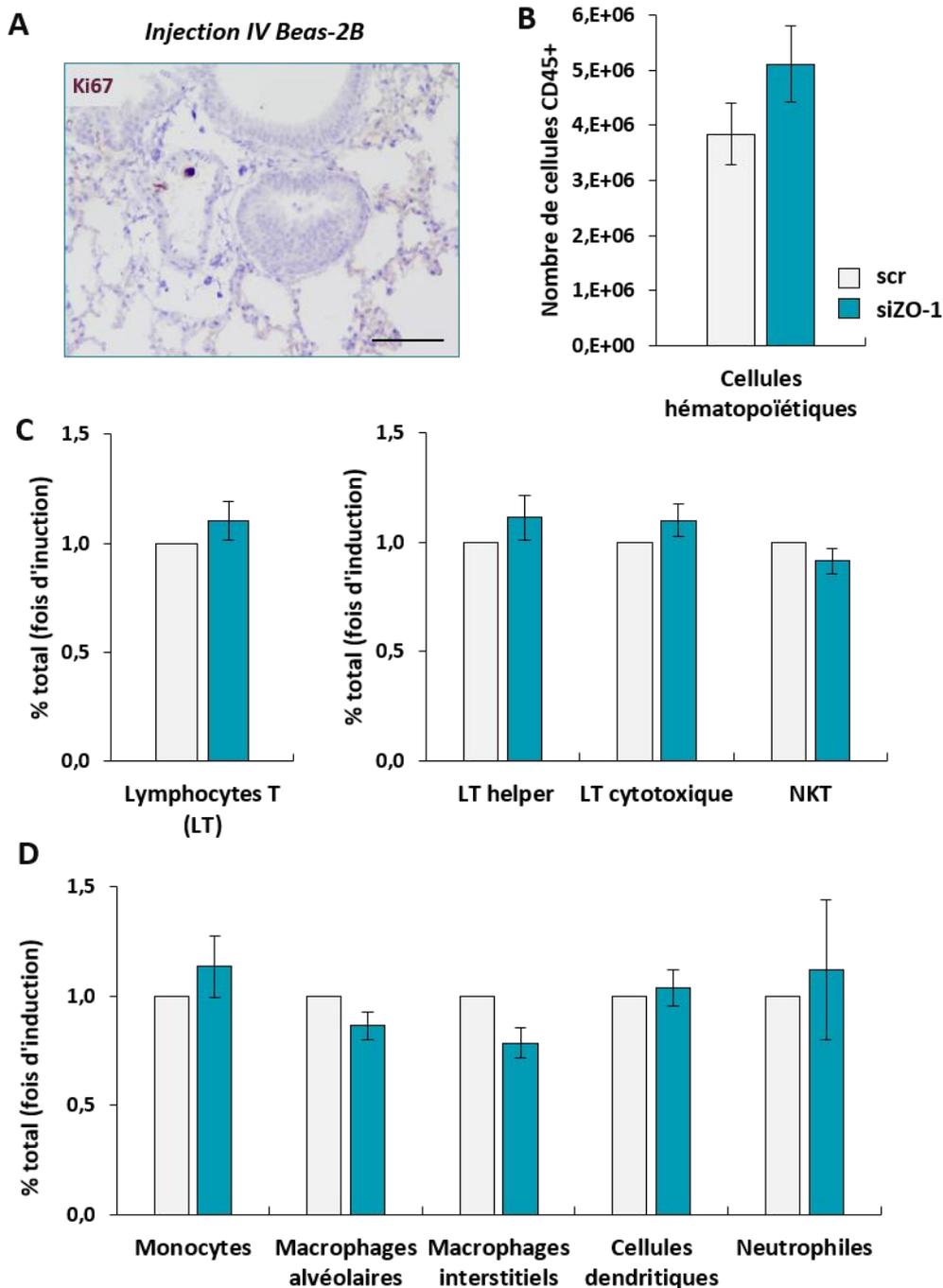


Figure 42 : Analyse de l'effet de l'injection en IV de cellules Beas-2B avec une expression de ZO-1 inhibée sur le recrutement de cellules inflammatoires au niveau pulmonaire *in vivo*

(A) L'analyse par immunohistochimie anti-Ki67 humaine permet de valider la présence de cellules Beas-2B au niveau pulmonaire, 24h post-injection en veine caudale (IV). Barre d'échelle = 80 μ m. (B) Le nombre de cellules hématopoïétiques CD45+ isolées, par la technique d'isolation par billes magnétiques CD45, est déterminé avant le passage au FACS. (C) L'analyse des différentes populations inflammatoires recrutées au niveau du poumon, 24h post-injection IV est réalisée au FACS et les résultats sont présentés en fois d'induction en fonction du pourcentage de cellules recrutées par rapport au pourcentage de cellules totales (n = 5).

IV. La localisation cyto-nucléaire de ZO-1 corrèle avec un infiltrat inflammatoire accru dans les CBNPC humains

Aux vues des résultats *in vitro* et *in vivo* précédents, nous avons caractérisé l'infiltrat inflammatoire en relation avec l'expression cyto-nucléaire de ZO-1 *in vivo* sur une banque d'échantillons humains de patients atteints de CBNPC. Pour cela, nous avons analysé les profils d'expression de ZO-1 et de différents marqueurs inflammatoires, tels que CD3, CD4, CD8 et N-élastase, ciblant respectivement les populations de lymphocytes T dont les cellules T auxiliaires et cytotoxiques et les neutrophiles (**Figures 43 & 44**).

Tout d'abord, l'analyse de la localisation membranaire et/ou cyto-nucléaire de ZO-1 sur les 42 cas de tumeurs a démontré une corrélation inverse chez les patients atteints de CBNPC. En effet, les tumeurs présentant des profils d'expression cyto-nucléaire de ZO-1 n'expriment peu ou pas de ZO-1 membranaire et inversement (**Figure 43**). Ces données témoignent de la délocalisation des protéines jonctionnelles au cours de la progression tumorale.

	Expression de ZO-1 cyto-nucléaire		
Expression de ZO-1 membranaire	ZO-1 <10% n=29	ZO-1 ≥10% n=13	P
ZO-1 <10%	10 (48%)	11 (52%)	0,0063 (**)
ZO-1 ≥10%	19 (90%)	2 (10%)	

Figure 43 : Corrélation inverse de l'expression cyto-nucléaire et membranaire de ZO-1

De plus, l'analyse des différents profils d'expression étudiés a mis en évidence une corrélation entre l'expression cyto-nucléaire de ZO-1 et la présence importante de lymphocytes T CD3 positifs. En effet, les échantillons présentant une forte expression de ZO-1 au niveau cyto-nucléaire ($\geq 10\%$ de cellules tumorales positives) sont associés à une forte densité de cellules T ($> 25\%$ de cellules T positives) par rapport aux tumeurs contenant moins de 10% de cellules tumorales positives ($p=0,0024$) (**Figure 44**). Par la suite, une étude approfondie a démontré que cette forte densité de cellules T s'apparente à des lymphocytes T cytotoxiques CD8 positifs (**Figure 44**). Ainsi, nous avons mis en évidence une corrélation entre la forte expression de ZO-1 cyto-nucléaire et un infiltrat inflammatoire de cellules T cytotoxiques important chez les patients atteints de CBNPC ($p=0,0459$).

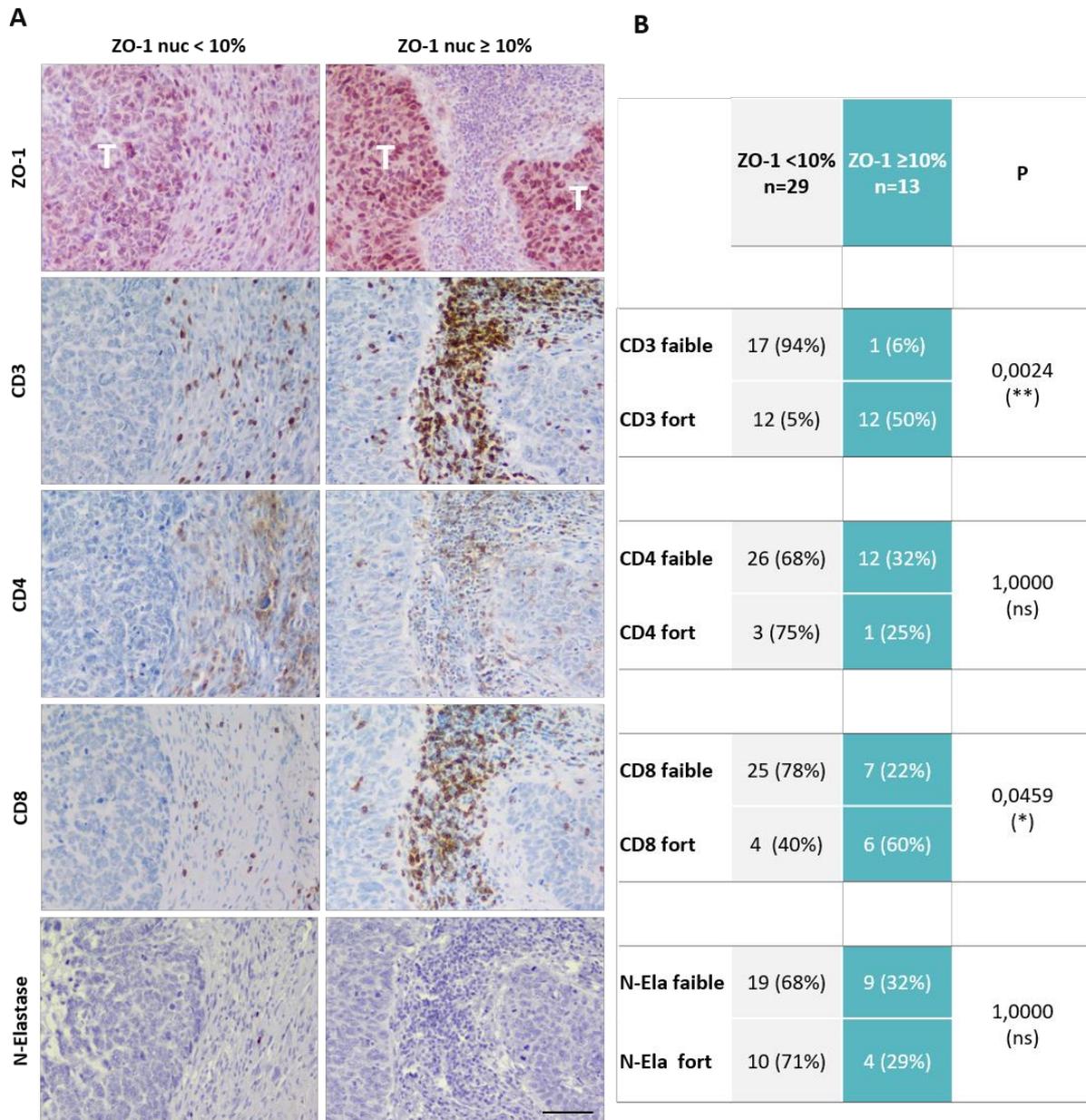


Figure 44 : Étude IHC de la corrélation de ZO-1 cyto-nucléaire avec l’infiltrat inflammatoire dans les tumeurs bronchiques humaines

(A) Les expressions de ZO-1 cyto-nucléaire, de CD3 (lymphocytes T), CD4 (lymphocytes T auxiliaires), CD8 (lymphocytes T cytotoxiques) et de la N-élastase (neutrophiles) ont été caractérisées sur des coupes sériées de tumeurs. Les zones indiquées T correspondent à la tumeur. Barre d’échelle = 80 µm. (B) Étude de la corrélation entre l’expression cyto-nucléaire de ZO-1 et l’expression de CD3, CD4, CD8 et N-élastase.

Suite à la mise en évidence de l'établissement d'un infiltrat immunitaire anti-tumoral important chez les patients CBNPC, nous avons analysé l'expression de marqueurs capables d'inhiber l'efficacité de la réponse immune. En effet, le ligand PD-L1, exprimé à la surface des cellules tumorales, et le facteur de transcription Foxp3, exprimé par les cellules immunosuppressives T régulatrices, sont des témoins d'inactivation des cellules immunitaires T. Nos analyses par IHC ont révélé une corrélation entre l'expression cyto-nucléaire de ZO-1 et la présence de cellules immunosuppressives T Foxp3 positives. Par la suite, nous avons montré que la présence de cellules T régulatrices corrèle avec la présence de cellules cytotoxiques CD8 positives dans les tumeurs bronchiques humaines (**Figure 45**).

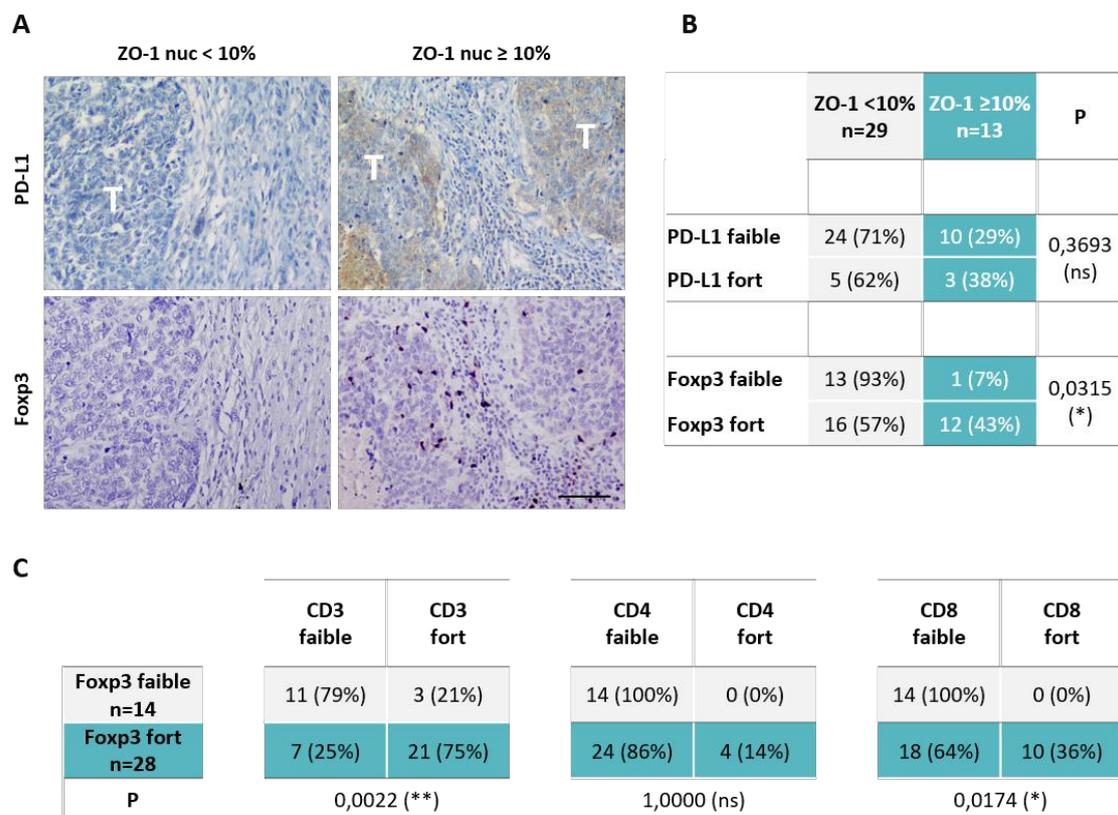


Figure 45 : Étude IHC de la corrélation de ZO-1 cyto-nucléaire avec l'expression de marqueurs d'immunosuppression dans les tumeurs bronchiques humaines

(A) Les expressions du ligand PD-L1 et du facteur de transcription Foxp3 ont été caractérisées sur des coupes sériées de tumeurs. Les zones indiquées T correspondent à la tumeur. Barre d'échelle = 80 µm. (B) Étude de la corrélation entre l'expression cyto-nucléaire de ZO-1 et l'expression de PD-L1 et Foxp3. (C) Étude de la corrélation entre l'expression de Foxp3 et l'expression des marqueurs de lymphocytes T.

Ainsi, ces données *in vivo* montrent l'inhibition de la réponse immune, notamment par inactivation des cellules T effectrices *via* le recrutement de cellules T immunosuppressives, chez les patients atteints de CBNPC.

V. ZO-1 cyto-nucléaire favorise la mise en place d'un microenvironnement inflammatoire pro-tumoral

1. ZO-1 favorise la sécrétion de chimiokines pro-inflammatoires *in vitro*

Nos précédents résultats ont mis en évidence l'effet pro-inflammatoire de la surexpression de ZO-1 cyto-nucléaire *in vitro* et *in vivo*. En revanche, l'inhibition de l'expression de ZO-1 diminue l'expression de la chimiokine IL-8 mais n'influence pas le recrutement de cellules inflammatoires. Afin de mieux comprendre le ou le(s) mécanismes impliqués dans ces phénomènes, nous avons étudié l'expression de 102 cytokines humaines à partir de milieux conditionnés concentrés de cellules Beas-2B transfectées soit par un vecteur codant l'ADNc de ZO-1 (pLNCX/ZO-1), soit par des siARN ciblant ZO-1 (scr/siZO-1) par *cytokine array*. Suite à l'analyse des différents spots, nous avons relevé 8 cytokines fortement régulées (**Figure 46**). Les cytokines GRO α , IL-6 et IL-8 sont respectivement surexprimées de 4,2 fois, 2,6 fois et 1,8 fois en condition ZO-1 et réprimées de 0,12 fois, 0,72 fois et 0,5 fois en condition siZO-1 par rapport à leur condition contrôle respective (**Figure 46**). Dans l'ensemble, ces cytokines interviennent majoritairement dans la phase aiguë de l'inflammation, notamment dans le recrutement de monocytes et de neutrophiles. De plus, des facteurs solubles impliqués dans l'angiogenèse sont régulés dans le même sens quel que soit la modulation d'expression de ZO-1. En effet, l'expression de l'angiogénine est réprimée de 0,8 fois en condition ZO-1 et 0,4 fois en condition siZO-1 tandis que le facteur de croissance vasculaire endothéliale VEGF est surexprimé de 1,2 fois en condition ZO-1 contre 2,9 fois en condition siZO-1 (**Figure 46**). En revanche, la pentraxine 3, régulateur de l'angiogenèse et stimulateur de l'expression du facteur tissulaire (TF) est surexprimée de 1,25 fois et réprimée de 0,6 fois, en corrélation avec la modulation de l'expression de ZO-1. Dans le même sens, l'expression de la gélatinase MMP-9 est fortement régulée par ZO-1 : elle est induite 2,6 fois en condition de surexpression de ZO-1 et réduite de 0,1 fois lorsque ZO-1 est réprimé. Pour finir, la régulation de l'expression du récepteur uPAR en fonction de l'expression de ZO-1 suggère l'implication de ZO-1 dans les systèmes de protéolyse, notamment celle du plasminogène (**Figure 46**).

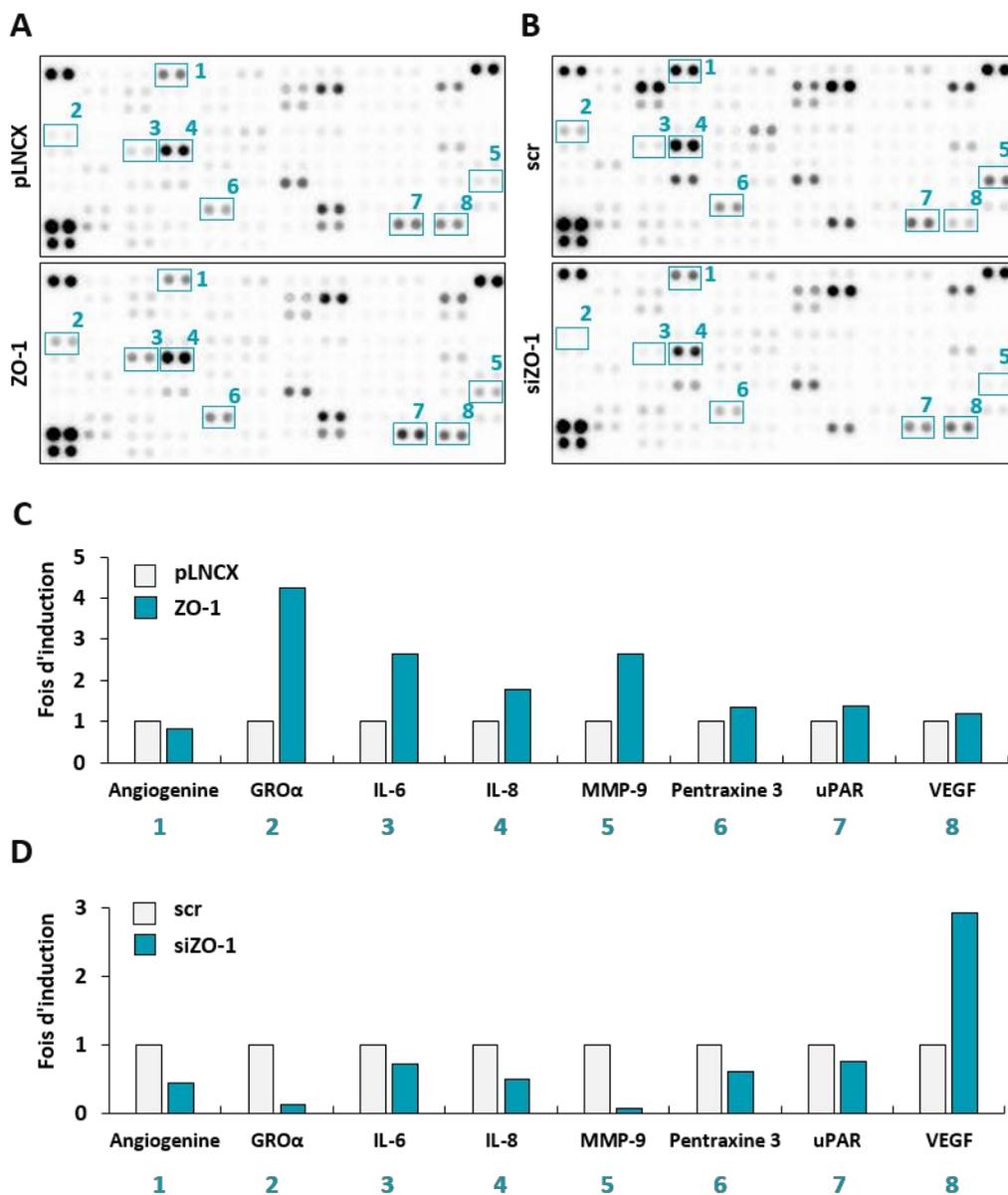


Figure 46 : Analyse de l'expression cytokinique des cellules Beas-2B en fonction la modulation d'expression de ZO-1 par cytokine array

Les cellules Beas-2B ont été transfectées transitoirement, (A-C) soit par un modèle de surexpression via un vecteur codant l'ADNc de ZO-1 (pLNCX vs ZO-1), (B-D) soit par un modèle d'inhibition par siARN dirigé spécifiquement contre ZO-1 (scr vs siZO-1). Les surnageants de ces cellules ont été récupérés, concentrés sur des colonnes 3 kDa puis dosés en cytokine array afin d'évaluer l'expression de 102 cytokines humaines dans les quatre conditions. Les encadrés bleus font référence aux spots dupliquant des cytokines sélectionnées dont un numéro a été attribué à chacune d'entre-elles. (C-D) Un panel de 8 cytokines d'intérêt a été sélectionné en fonction de leur grande variabilité d'expression entre les milieux conditionnés Beas-2B (C) pLNCX/ZO-1 et (D) scr/siZO-1.

2. ZO-1 joue un rôle dans la régulation des protéases

Par la suite, nous avons évalué l'activité catalytique des gélatines MMP-2 et -9 en fonction de l'expression de ZO-1 par zymographie. En accord avec les résultats de *cytokine array*, nous observons une régulation de la sécrétion de la gélatinase MMP-9 par ZO-1. En revanche, l'activité de la gélatinase MMP-2 ne semble pas affectée par la modulation d'expression de ZO-1 (**Figure 47**). La surexpression de ZO-1 favorise donc les phénomènes de protéolyse de la MEC à travers la régulation de l'expression de la MMP-9.

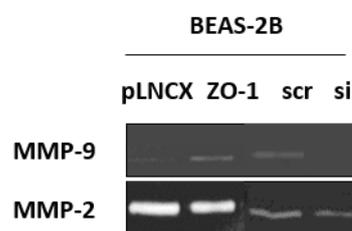


Figure 47 : Effet de la modulation de ZO-1 sur l'expression des protéases

Les cellules Beas-2B et BZR ont été transfectées transitoirement, soit par un modèle de surexpression via un vecteur codant l'ADNc de ZO-1 (pLNCX vs ZO-1), soit par un modèle d'inhibition par siARN dirigé spécifiquement contre ZO-1 (scr vs siZO-1). L'activité catalytique des gélatinases MMP-2 et MMP-9 a été évaluée par zymographie en gel de gélatine ($n = 3$).

3. ZO-1 joue un rôle dans la régulation des protéines jonctionnelles

Afin de poursuivre notre étude sur les mécanismes utilisés par ZO-1 cyto-nucléaire, nous avons évalué l'expression de différentes protéines jonctionnelles en relation avec ZO-1 par *western-blotting*. Dans un premier temps, nos résultats montrent une diminution de l'expression de la cadhérine-E dans les cellules Beas-2B contrairement aux cellules BZR qui possèdent un taux basal déjà faible (**Figure 48 A**). Dans un second temps, l'inhibition de l'expression de ZO-1 par des siARN dans les cellules Beas-2B et BZR diminue l'expression de la cadhérine-E en faveur de l'expression de la cadhérine-N. Ces régulations protéiques sont caractéristiques d'un phénomène de TEM (**Figure 48 B**). A l'inverse, l'expression de la vimentine, biomarqueur principal de la TEM, n'est pas affectée. De plus, nous observons une diminution de l'expression des protéines jonctionnelles transmembranaires occludine et JAM-1 lorsque l'expression de ZO-1 est réprimée (**Figure 48 B**). Nos données montrent donc

une régulation importante de l'expression des protéines jonctionnelles en fonction de la modulation de ZO-1.

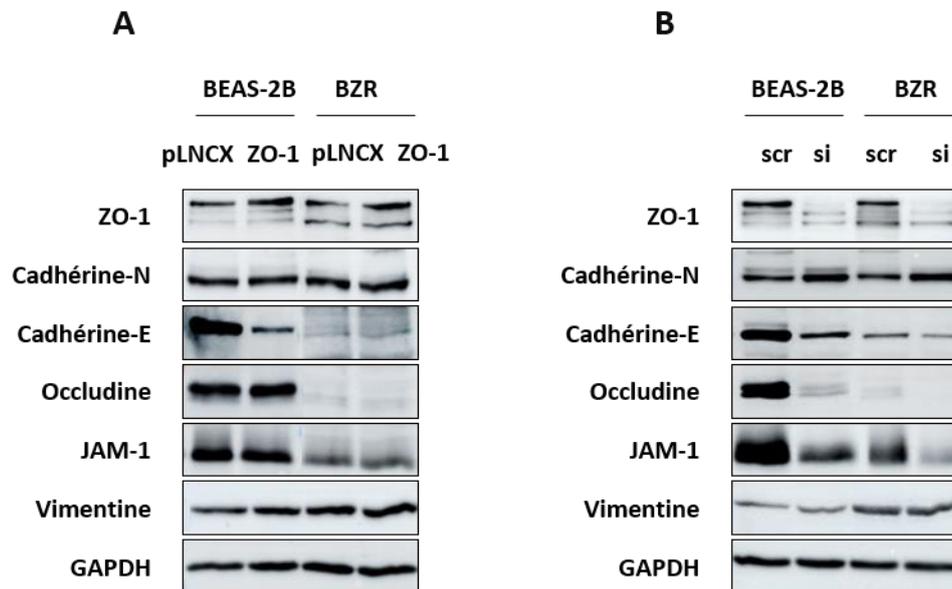


Figure 48 : Effet de la modulation de ZO-1 sur l'expression des protéines jonctionnelles

Les cellules Beas-2B et BZR ont été transfectées transitoirement, (A) soit par un modèle de surexpression via un vecteur codant l'ADNc de ZO-1 (pLNCX vs ZO-1), (B) soit par un modèle d'inhibition par siARN dirigé spécifiquement contre ZO-1 (scr vs siZO-1). Les expressions des protéines cadhérine-N, cadhérine-E, occludine, JAM-1 et vimentine ont été analysées par western-blotting. Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes ($n = 3$). L'expression de la GAPDH sert de contrôle de dépôt.

Au total, l'ensemble de nos résultats place ZO-1 dans un rôle central, laissant présager de nombreux partenaires protéiques membranaires et/ou cytoplasmiques, responsables de la régulation différentielle des chimiokines pro-inflammatoires.

DISCUSSION

Dans cette étude, nous confirmons que la localisation cyto-nucléaire de ZO-1, associée à un phénomène de TEM, régule l'expression transcriptionnelle et protéique de la chimiokine IL-8 dans les cellules bronchiques invasives. Ainsi, la surexpression de ZO-1 cyto-nucléaire augmente la sécrétion de la chimiokine pro-inflammatoire IL-8 dans les milieux conditionnés de cellules invasives. *In vitro*, nous démontrons d'ailleurs une augmentation du recrutement de la lignée monocyttaire THP-1 par des milieux conditionnés de cellules invasives surexprimant ZO-1. *In vivo*, à partir de deux modèles murins différents, nous montrons le recrutement de cellules inflammatoires et immunitaires induit par ZO-1. De plus, *in vivo*, dans les tumeurs broncho-pulmonaires humaines, nous montrons que l'expression cyto-nucléaire de ZO-1 est corrélée à un infiltrat lymphocytaire T cytotoxique augmenté. La corrélation établie entre cet infiltrat et celui de cellules immunosuppressives T régulatrices remet en cause l'activation des cellules T effectrices. Pour finir, notre analyse par *cytokine array* montre la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et pro-invasives induites par ZO-1, favorable à la mise en place d'un microenvironnement pro-inflammatoire tumoral.

Dans un premier temps, nous avons confirmé que la modulation d'expression de ZO-1, *in vitro*, dans les lignées bronchiques invasives Beas-2B et BZR, qui l'expriment spontanément de façon cyto-nucléaire, induit une régulation de l'expression de l'ARNm et de la sécrétion de la chimiokine IL-8. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Beutheu Youmba qui ont mis en évidence que la redistribution subcellulaire de ZO-1 membranaire dans des cellules Cacos-2 traitées au méthotrèxate augmente l'expression de cytokines pro-inflammatoires, telle que l'IL-8 (Beutheu Youmba *et al.* 2012). Nos données complètent également les travaux de Brysse *et al.* et Lesage *et al.* qui ont établi une corrélation positive entre le niveau d'expression de l'IL-8 et la localisation cyto-nucléaire de ZO-1 dans des lignées mammaires et bronchiques respectivement (Brysse *et al.* 2012, Lesage *et al.* 2017). Ces travaux ont aussi montré que, la transfection des lignées épithéliales 16HBE et MCF-7, qui présentent une expression membranaire de ZO-1, par des siARN ciblant spécifiquement ZO-1, ne module pas l'expression de l'IL-8. De plus, l'induction d'une TEM dans les cellules épithéliales A549 et MCF10A, possédant un phénotype transitoire capable de délocaliser ZO-1 de la membrane vers les compartiments cytoplasmique et nucléaire, module l'expression de l'IL-8. En effet, le traitement des A549 au TGF- β (Lesage *et al.* 2017) et MCF10A à l'EGF (Brysse *et al.* 2012), relocalise ZO-1 dans le noyau et induit une surexpression de la chimiokine IL-8 dans ces

cellules épithéliales. De plus, une étude précédente du laboratoire a également mis en évidence que la relocalisation nucléaire de ZO-1 est liée à la confluence des cellules. En effet, les MCF10A stationnaires confluentes expriment ZO-1 de façon sub-membranaire tandis que les MCF10A migratoires éparses l'expriment de façon cyto-nucléaire (Polette *et al.* 2007). Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère une importance du phénotype représentatif de la plasticité cellulaire ; c'est-à-dire, la faculté d'une cellule à passer d'un phénotype épithélial à un phénotype mésenchymateux ; associée à la localisation de ZO-1, dans la régulation de la chimiokine IL-8.

À la suite de la mise en évidence d'un lien entre l'expression cyto-nucléaire de ZO-1 et l'expression de la chimiokine IL-8, majoritairement connue pour ses capacités pro-inflammatoires, nous avons évalué le rôle de ZO-1 dans l'établissement d'un microenvironnement inflammatoire. Les études *in vitro* réalisées à partir de la lignée monocyttaire THP-1 ont mis en évidence un recrutement plus important de monocytes par les milieux conditionnés de cellules surexprimant ZO-1 par rapport aux contrôles. L'augmentation de la sécrétion de chimiokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-8, par les cellules surexprimant ZO-1 favorise ainsi le recrutement de monocytes *in vitro*. En lien, une étude de Van Furth R. *et al.* a mis en évidence l'influence d'une condition inflammatoire chez la souris sur le recrutement des monocytes circulants. En effet, le nombre de monocytes quittant la circulation sanguine par jour est doublé lors d'une stimulation inflammatoire (Furth, Diesselhoff-den Dulk, and Mattie 1973). De plus, des études ont montré l'implication de la protéine chimio-attractante des monocytes MCP-1 dans le recrutement des monocytes (Muller 2001, Deshmane *et al.* 2009). Or, la sécrétion de MCP-1 augmente de 1,34 fois dans les milieux conditionnés de cellules Beas-2B surexprimant ZO-1 comparés aux milieux contrôles. Ces résultats *in vitro* témoignent des capacités chimio-attractives induit par ZO-1, notamment au niveau des monocytes, suggérant ainsi un lien indirect avec le recrutement de macrophages et/ou de cellules dendritiques. Une fois dans le tissu, les monocytes peuvent, en effet, se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques (Muller 2001). Ces données *in vitro* sont donc à mettre en lien avec l'augmentation significative du recrutement de macrophages interstitiels et une diminution significative du recrutement de cellules dendritiques au niveau des poumons de souris injectées en intraveineuse par des cellules Beas-2B surexprimant ZO-1. Nos résultats corrélerent avec les données de la littérature et

notamment avec une récente étude sur les biomarqueurs de cellules sanguines qui a mis en évidence une diminution du nombre de cellules dendritiques dans le sang de patients CBNPC comparé au sang de patients contrôles (Riemann *et al.* 2018). De plus, la diminution du taux de cellules dendritiques chez les patients atteints de mélanome est associée à un mauvais pronostic (Chevolet *et al.* 2015). A l'inverse, les macrophages sont augmentés dans de nombreux cancers. En effet, la majorité des études sur des tissus tumoraux humains ont démontré un nombre plus important de macrophages associés aux tumeurs, en corrélation avec un mauvais pronostic clinique (Yang and Zhang 2017). En lien avec les données de la littérature, nos résultats *in vivo* murins par le modèle de métastases témoignent donc du rôle pro-inflammatoire de ZO-1 dans le recrutement de cellules de l'immunité innée circulantes au sein d'un microenvironnement favorable au développement tumoral.

Par la suite, l'étude de l'influence de ZO-1 sur le recrutement de cellules inflammatoires *in vivo* par un modèle murin de *sponge assay* a permis de mettre en évidence des infiltrats granulocytiques et immunitaires. En effet, l'analyse des éponges imbibées de milieux conditionnés de cellules Beas-2B surexprimant ZO-1 à 3 et 21 jours d'implantation a révélé un recrutement significativement plus important de neutrophiles et de lymphocytes T comparé aux éponges contrôles. A 3 jours, les neutrophiles représentent 70 à 75% des cellules recrutées au sein des éponges contre 1 à 5% de lymphocytes T. A 21 jours, la population de neutrophiles est estimée entre 5 à 10% des cellules de l'infiltrat de l'éponge contre 20 à 25% de lymphocytes T. De même, nous avons également observé un recrutement plus important de lymphocytes T dans notre modèle *in vivo* de métastases. L'ensemble de ces données est d'ailleurs à mettre en lien avec les résultats obtenus à partir du *cytokine array*. En effet, nous avons observé une augmentation de la sécrétion de plusieurs cytokines pro-inflammatoires, notamment GRO α , l'IL-6 et l'IL-8, dans les milieux conditionnés de cellules Beas-2B transfectées avec le plasmide ZO-1 comparés aux contrôles. Ces cytokines pourraient donc être impliquées dans le recrutement de neutrophiles au sein des éponges imbibées de ces mêmes milieux conditionnés. Ainsi, nos résultats témoignent de l'implication de ZO-1 dans l'établissement d'un microenvironnement inflammatoire, majoritairement constitué de neutrophiles à 3 jours, qui persiste à 21 jours. D'après la littérature, il existe un lien entre le recrutement de neutrophiles et la mise en place d'un microenvironnement tumoral. En effet, des études ont montré l'implication des TAN, associé à un mauvais pronostic, dans la

croissance et l'invasion tumorale, les métastases et l'angiogenèse (Powell and Huttenlocher 2016). Plus précisément, les neutrophiles, exprimant à leur surface les récepteurs CXCR1 et CXCR2, sont recrutés par des chimiokines telles que l'IL-6 et l'IL-8 et produisent à leur tour des facteurs solubles pro-tumorales tels que le VEGF et la MMP-9 par exemple (Powell and Huttenlocher 2016, Tazzyman, Lewis, and Murdoch 2009). L'inflammation chronique créée par la persistance de recrutement des neutrophiles à 21 jours dans nos éponges peut d'ailleurs être favorable à un développement tumoral, et conduit au recrutement d'autres cellules au sein du microenvironnement inflammatoire. En effet, les populations de neutrophiles et de lymphocytes T représentent jusqu'à 35% des cellules infiltrées au sein des éponges, ce qui suggère le recrutement d'autres types cellulaires comme des cellules endothéliales ou des cellules immunosuppressives par exemple. Dans ce sens, des études *in vivo* ont montré le rôle pro-angiogénique de ZO-1, et la corrélation entre les cellules TEM+ et le recrutement de cellules myéloïdes suppressives MDSC dans les cancers broncho-pulmonaires et mammaires respectivement (Lesage *et al.* 2017, Suarez-Carmona *et al.* 2015). Par ailleurs, la mise en place d'une réponse immunitaire T par ZO-1 dans notre modèle *in vivo* murin de *sponge assay* est à mettre en lien avec la corrélation *in vivo* entre l'expression cyto-nucléaire de ZO-1 et la présence importante de lymphocytes T cytotoxiques CD8+ établie chez les patients CBNPC. De même, des données de la littérature montrent une infiltration importante de cellules T cytotoxiques dans de nombreux cancers (Thompson *et al.* 2017, Oelkrug and Ramage 2014). Bien souvent, cet infiltrat cytotoxique corrèle avec une altération de la survie générale des patients à travers un système de résistance immunitaire adaptative. En effet, plusieurs études ont mis en évidence l'implication de divers mécanismes d'immunosuppression, utilisés par les cellules tumorales pour résister au système immunitaire (Thompson *et al.* 2017). De ce fait, nous avons étudié la présence des marqueurs immuno-suppressifs PD-L1 et Foxp3 en corrélation avec l'expression cyto-nucléaire de ZO-1 et l'infiltrat cytotoxique. Nos analyses chez les patients CBNPC n'ont révélé aucune corrélation entre l'expression cyto-nucléaire de ZO-1 et l'expression de PD-L1. Cependant, le changement du *cut-off* défini pour le *scoring* du marqueur CD8 permet de révéler une corrélation entre la présence d'un infiltrat cytotoxique CD8+ et l'expression de PD-L1 ($p=0,0427$). Ces résultats sont en accord avec des études montrant l'implication du mécanisme PD-1/PD-L1 dans l'inactivation des cellules T cytotoxiques dans les cancers (Thompson *et al.* 2017, Sacher and Gandhi 2016). De plus, nous avons montré une corrélation entre l'expression cyto-nucléaire de ZO-1, associée à un infiltrat

cytotoxique élevé, et la présence importante de cellules T régulatrices Foxp3+ chez les patients CBNPC. En accord avec les données de la littérature, nous montrons une population élevée de cellules T régulatrices Foxp3+, inhibitrices des cellules T effectrices, dans les CBNPC, associée à un mauvais pronostic (Wei, Kryczek, and Zou 2006, Maury *et al.* 2010).

Par ailleurs, nous avons étudié l'impact de l'inhibition de ZO-1 sur le recrutement de cellules inflammatoires *in vitro* et *in vivo*. Cette inhibition de ZO-1 dans les cellules Beas-2B et BZR n'a révélé aucune différence significative de recrutement de la lignée THP-1 *in vitro* et du recrutement inflammatoire *in vivo* dans le modèle de métastases. Par ailleurs, l'étude *in vivo* par le modèle de *sponge assay* révèle une diminution significative du recrutement cellulaire à 21 jours dans les éponges imbibées de milieux conditionnés de cellules Beas-2B transfectées avec des siARN ciblant ZO-1. Ces résultats, en opposition avec ceux obtenus avec les expériences de surexpression de ZO-1, suggèrent l'implication de systèmes de régulation différents du recrutement cellulaire entre la surexpression et l'inhibition de ZO-1. En lien, nos résultats concernant l'inhibition de l'expression transcriptionnelle et protéique de l'IL-8 par ZO-1 dans les lignées Beas-2B et BZR transfectées par des siARN ciblant ZO-1 écarte l'hypothèse d'une implication majoritaire de la chimiokine IL-8 dans la diminution du recrutement cellulaire dépendant de ZO-1. De plus, cette différence de réponse de ZO-1 peut s'expliquer par l'implication d'un mécanisme de régulation particulier lors de la surexpression d'une forme exogène de ZO-1 par l'intégration d'un plasmide, et l'utilisation d'un autre mécanisme pour l'inhibition de l'expression endogène de ZO-1 par des siARN. Par ailleurs, la maîtrise de la confluence des cellules est un facteur essentiel pour maintenir l'équilibre entre la répartition membranaire et cyto-nucléaire de ZO-1. Ainsi, l'inégalité de répartition de la distribution de ZO-1 dans la cellule pourrait expliquer une différence de réponse biologique notable. En effet, des études ont obtenu des résultats contradictoires concernant l'impact de la surexpression de ZO-2 sur la prolifération des cellules pouvant s'expliquer par une instabilité des jonctions cellules-cellules à la suite d'une accumulation anormale de ZO-2 exogène à la membrane (Gonzalez-Mariscal *et al.* 2014).

Afin d'expliquer les différences potentielles existantes entre l'intégration d'un plasmide codant l'ADNc de ZO-1 et l'inhibition de l'expression de ZO-1 par siARN, nous avons étudié la différence de sécrétion cytokinique à partir de milieux conditionnés de cellules Beas-2B dont l'expression de ZO-1 a été modulée (cDNA/siARN). Nos résultats ont révélé une augmentation

de la sécrétion de nombreux facteurs solubles pro-inflammatoires et pro-invasifs tels que GRO α , IL-6, IL-8, MCP-1 ou encore la MMP-9 dans les milieux conditionnés de cellules Beas-2B surexprimant ZO-1 comparés aux milieux contrôles. *A contrario*, nous avons observé une diminution de la sécrétion de ces mêmes facteurs dans les milieux conditionnés de cellules Beas-2B dont l'expression de ZO-1 est inhibée. En revanche, lorsque ZO-1 est inhibé, certains facteurs solubles pro-invasifs sont également augmentés comme le VEGF par exemple. Dans le même but, nous avons étudié l'influence de ZO-1 sur la régulation des autres protéines jonctionnelles telles que l'occludine, JAM-1, les cadhérines-E et -N et la vimentine. Au final, lorsque ZO-1 est surexprimé, seule l'expression de la cadhérine-E est inhibée tandis que lorsque ZO-1 est inhibé, l'expression de la cadhérine-E, de l'occludine et de JAM-1 est diminuée et l'expression de la cadhérine-N est augmentée. D'après les données de la littérature, la perte d'expression de ZO-1 au niveau de la membrane provoque une dérégulation des jonctions intercellulaires, favorable à un comportement pro-invasif. Dans le même sens, la diminution de l'expression de la cadhérine-E est bien souvent associée à un phénotype mésenchymateux pro-invasif (Gonzalez-Mariscal *et al.* 2014). Or, nos résultats suggèrent que la perte majoritaire de ZO-1 cyto-nucléaire endogène permet un phénotype plus invasif. Nous émettons donc l'hypothèse de l'existence de systèmes de compensation ou de boucles de rétrocontrôle dans les cellules invasives présentant une diminution d'expression de ZO-1 cyto-nucléaire, qui permettraient de palier à la perte d'un phénotype pro-invasif en « défaveur » d'un phénotype épithélial. Ainsi, la plasticité des cellules et le taux d'expression basal de ZO-1 cyto-nucléaire par les cellules pourraient expliquer la différence de réponse obtenue en fonction de la méthode de transfection utilisée. Autrement dit, la surexpression de ZO-1 exogène ou l'inhibition de l'expression endogène de ZO-1 cyto-nucléaire dans une lignée présentant un phénotype épithélial ou invasif ancré n'a pas d'influence sur la mise en place d'un microenvironnement inflammatoire. A l'inverse, la modulation de l'expression cyto-nucléaire de ZO-1 dans des lignées présentant un phénotype intermédiaire, par délocalisation et/ou surexpression du pool cyto-nucléaire de ZO-1, influence l'établissement d'un infiltrat inflammatoire chronique pro-tumoral.

Au final, l'ensemble de nos résultats montre que, lorsqu'il est délocalisé des complexes intercellulaires, ZO-1 induit différents signaux chimiotactiques permettant le recrutement de cellules inflammatoires et/ou immunitaires dans un microenvironnement pro-tumoral.

CONCLUSION - PERSPECTIVES

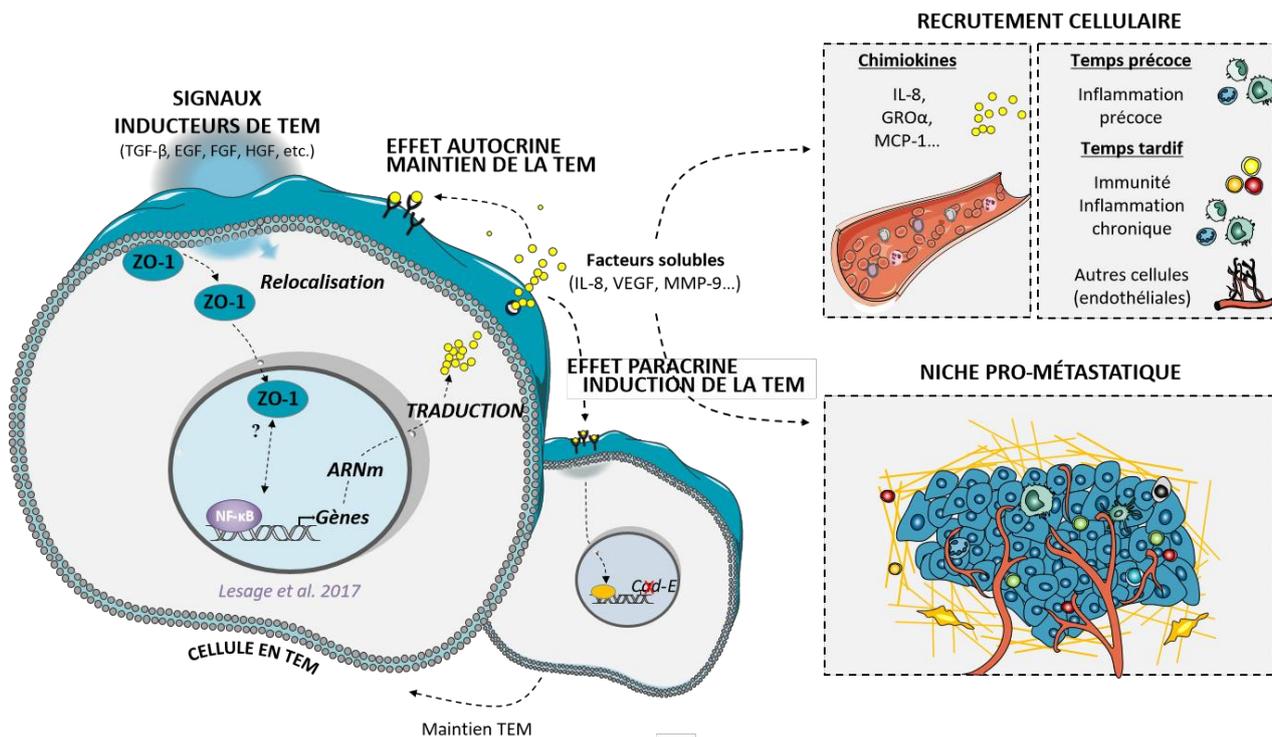


Figure 49 : Schéma récapitulatif du rôle de ZO-1 cyto-nucléaire dans la mise en place d'un microenvironnement pro-inflammatoire/immunitaire tumoral

Durant la progression tumorale, des signaux inducteurs tels que TGF- β , EGF, FGF ou encore HGF sont à l'origine de la mise en place d'une TEM. Ce processus entraîne alors des modifications moléculaires responsables de l'acquisition de propriétés mésenchymateuses invasives par les cellules épithéliales tumorales. Au cours de ces modifications, les protéines des jonctions intercellulaires sont désorganisées et notamment ZO-1, qui est délocalisé de la membrane vers les compartiments cyto-nucléaire. Dans le noyau, ZO-1 agit comme co-facteur de transcription capable d'induire la sécrétion de différents facteurs solubles dans le milieu extracellulaire, comme la chimiokine pro-inflammatoire IL-8 par exemple. A travers différents récepteurs membranaires, les facteurs solubles participent à l'induction et au maintien de la TEM et interviennent dans le recrutement séquentiel de cellules inflammatoires et immunitaires. A temps précoce, ZO-1 cyto-nucléaire induit un recrutement de cellules inflammatoires qui se caractérise, à temps tardif par la présence d'un infiltrat inflammatoire chronique et immunitaire pro-tumoral. D'autres cellules, comme les cellules endothéliales, sont également recrutées, favorisant le passage des cellules tumorales à travers la paroi vasculaire. Ainsi, ZO-1 cyto-nucléaire permet l'établissement d'un microenvironnement pro-inflammatoire/immunitaire tumoral, favorable à la dissémination métastatique.

En conclusion, ces travaux apportent de nouvelles données concernant le rôle de ZO-1 dans la régulation de deux processus fondamentaux, la progression tumorale et l'inflammation. En effet, à travers sa localisation cyto-nucléaire, ZO-1 participerait à l'établissement d'un microenvironnement pro-inflammatoire et/ou pro-immunitaire qui serait permissif pour la progression tumorale des CBNPC. Par ailleurs, nos résultats complètent les données de la

littérature qui montrent l'implication de la TEM dans l'inflammation. En effet, il a été montré que les cellules TEM⁺ sont capables d'exprimer différents facteurs solubles influençant le recrutement de cellules myéloïdes suppressives (Suarez-Carmona *et al.* 2015), et inversement, que la sécrétion de certaines cytokines pro-inflammatoires chronique telles que le TNF- α , TGF- β et IL-1 β peut conduire à l'établissement d'une TEM dans les cellules CBNPC (Li *et al.* 2016). Ainsi, nos données, qui mettent en lien pour la première fois la protéine ZO-1 avec des processus inflammatoires chroniques, renforcent l'idée que ZO-1 contribue à la mise en place et au maintien d'un microenvironnement tumoral.

En perspective de ce travail, il serait important de déterminer l'influence de la localisation membranaire/cyto-nucléaire de ZO-1 en fonction de son niveau d'expression dans des lignées présentant des phénotypes différents. En effet, nos résultats suggèrent une régulation différente par ZO-1 en fonction du phénotype des cellules mais également selon la localisation et le taux d'expression basal de ZO-1. Ainsi, l'établissement d'un vecteur codant l'ADNc de ZO-1 couplé à une protéine fluorescente de type GFP permettrait la distinction de localisation entre l'expression de ZO-1 endogène et exogène. De plus, la réalisation de fractions membranaires, cytoplasmiques et nucléaires de ZO-1 dans nos lignées invasives pulmonaires Beas-2B et BZR transfectées transitoirement par le plasmide ZO-1 ou par des siARN ZO-1 permettrait d'obtenir des informations complémentaires sur les taux d'expression de ZO-1 dans les différents compartiments cellulaires. De plus, nous pourrions utiliser des anticorps bloquants de différentes régions de ZO-1 en vue de définir une potentielle activité de ZO-1, dépendante d'une région particulière qui se localiserait soit à la membrane, soit dans le noyau des cellules. Aussi, dans le but d'approfondir nos connaissances sur la relocalisation de ZO-1 dans le noyau, nous pourrions étudier la structure tridimensionnelle adoptée par ZO-1 dans les différents compartiments cellulaires. Certains domaines PDZ par exemple, impliqués dans la localisation membranaire de ZO-1 et de nombreuses interactions protéiques, pourraient moduler la plasticité cellulaire par régulation de la stabilité des complexes jonctionnels.

En parallèle, l'implication de ZO-1 dans le recrutement de cellules inflammatoires au sein d'un microenvironnement tumoral devra être explorée davantage. En effet, si nos données établissent une corrélation entre ZO-1 cyto-nucléaire et un infiltrat inflammatoire chronique,

l'axe de régulation utilisé reste un champ d'investigation important. Pour cela, l'ajout d'un anticorps bloquant l'expression de certaines chimiokines, comme l'IL-8 par exemple, dans les milieux conditionnés de cellules Beas-2B surexprimant ZO-1 pourrait s'avérer prometteur. De plus, l'utilisation de souris humanisées dans notre modèle de *sponge assay* permettrait une étude précise à partir d'un système immunitaire plus proche de celui de l'Homme. D'autre part, l'identification des populations inflammatoires et/ou immunitaires recrutées au sein de nos éponges à 21 jours devra être complétée, notamment par la caractérisation de la sous-population de lymphocytes T CD3+ recrutés. Elle pourra également être approfondie par l'investigation de nouvelles populations inflammatoires, comme les macrophages par exemple, *via* une technique d'immuno-marquage anti-F4/80.

Pour aller plus loin, nous pourrions examiner l'implication de ZO-1 sur la différenciation des cellules inflammatoires. Pour cela, nous mesurerions l'impact des milieux conditionnés ZO-1 sur des cultures primaires de cellules de patients (monocytes ou lymphocytes). L'analyse des populations cellulaires obtenues après 24h d'incubation avec les milieux conditionnés pourrait alors être réalisée au FACS *via* trois intégrines CD11a, CD11b et CD18 permettant la caractérisation phénotypique des populations monocytaires et macrophagiques et CD3, CD4, CD8 et CD20 pour la différenciation lymphocytaire.

Pour finir, nous pourrions approfondir la caractérisation de l'infiltrat inflammatoire chez les patients CBNPC, notamment par l'analyse des populations macrophagiques *via* des immunomarquages spécifiques anti-CD68 et anti-CD206 ciblant respectivement les macrophages M1 et M2. Par ailleurs, nous avons établi une corrélation entre la localisation cyto-nucléaire de ZO-1 et l'expression du marqueur CD8 témoignant du recrutement d'un infiltrat inflammatoire cytotoxique important chez les patients CBNPC. ZO-1 pourrait donc devenir un biomarqueur pronostic et ainsi constituer un outil dans la prédiction du potentiel métastatique des tumeurs *via* l'établissement d'un microenvironnement et dans des choix de traitement à visée immuno-thérapeutique. Dans cette optique, l'augmentation du nombre de cas étudiés pourrait permettre une plus grande robustesse dans nos résultats et une étude rétrospective à plus grande échelle.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

A

- [1] Acloque, H., M. S. Adams, K. Fishwick, M. Bronner-Fraser, and M. A. Nieto. 2009. "Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease." *J.Clin.Invest* 119 (6):1438-1449.
- [2] Adachi, M., A. Inoko, M. Hata, K. Furuse, K. Umeda, M. Itoh, and S. Tsukita. 2006. "Normal establishment of epithelial tight junctions in mice and cultured cells lacking expression of ZO-3, a tight-junction MAGUK protein." *Mol Cell Biol* 26 (23):9003-15. doi: 10.1128/mcb.01811-05.
- [3] Afshar, M., J. A. Poole, G. Cao, R. Durazo, R. C. Cooper, E. J. Kovacs, and J. H. Sisson. 2016. "Exhaled Nitric Oxide Levels Among Adults With Excessive Alcohol Consumption." *Chest* 150 (1):196-209.
- [4] Akalay, I., B. Janji, M. Hasmim, M. Z. Noman, F. Andre, P. De Cremoux, P. Bertheau, C. Badoual, P. Vielh, A. K. Larsen, M. Sabbah, T. Z. Tan, J. H. Keira, N. T. Hung, J. P. Thiery, F. Mami-Chouaib, and S. Chouaib. 2013. "Epithelial-to-mesenchymal transition and autophagy induction in breast carcinoma promote escape from T-cell-mediated lysis." *Cancer Res* 73 (8):2418-27. doi: 10.1158/0008-5472.can-12-2432.
- [5] Aldington, S., M. Harwood, B. Cox, M. Weatherall, L. Beckert, A. Hansell, A. Pritchard, G. Robinson, and R. Beasley. 2008. "Cannabis use and risk of lung cancer: a case-control study." *Eur.Respir.J.* 31 (2):280-286.
- [6] Aldinucci, D., and A. Colombatti. 2014. "The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression." *Mediators Inflamm* 2014:292376. doi: 10.1155/2014/292376.
- [7] Ali, S., and G. Lazennec. 2007. "Chemokines: novel targets for breast cancer metastasis." *Cancer Metastasis Rev* 26 (3-4):401-20. doi: 10.1007/s10555-007-9073-z.
- [8] American Cancer Society. 2008. *Cancer Facts & Figures*.
- [9] American Cancer Society. 2012. *Lung cancer (Non-Small Cell)*.
- [10] Amos, C. I., X. Wu, P. Broderick, I. P. Gorlov, J. Gu, T. Eisen, Q. Dong, Q. Zhang, X. Gu, J. Vijayakrishnan, K. Sullivan, A. Matakidou, Y. Wang, G. Mills, K. Doheny, Y. Y. Tsai, W. V. Chen, S. Shete, M. R. Spitz, and R. S. Houlston. 2008. "Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1." *Nat.Genet.* 40 (5):616-622.
- [11] Anastasiadis, P. Z., and A. B. Reynolds. 2001. "Regulation of Rho GTPases by p120-catenin." *Curr Opin Cell Biol* 13 (5):604-10.
- [12] Anderson, J. M., B. R. Stevenson, L. A. Jesaitis, D. A. Goodenough, and M. S. Mooseker. 1988. "Characterization of ZO-1, a protein component of the tight junction from mouse liver and Madin-Darby canine kidney cells." *J Cell Biol* 106 (4):1141-9.
- [13] Andersson, A., S. C. Yang, M. Huang, L. Zhu, U. K. Kar, R. K. Batra, D. Elashoff, R. M. Strieter, S. M. Dubinett, and S. Sharma. 2009. "IL-7 promotes CXCR3 ligand-dependent T cell antitumor reactivity in lung cancer." *J Immunol* 182 (11):6951-8. doi: 10.4049/jimmunol.0803340.
- [14] Angadi Punnya V., and Kale Alka D. 2015. "Epithelial-mesenchymal transition - A fundamental mechanism in cancer progression : An overview." 8 (2). doi: 10.4103/2349-5006.174233.

- [15] Aniansson Zdolsek, H., J. Ernerudh, P. G. Holt, J. Nilsson, and B. Bjorksten. 1999. "Expression of the T-cell markers CD3, CD4 and CD8 in healthy and atopic children during the first 18 months of life." *Int Arch Allergy Immunol* 119 (1):6-12. doi: 10.1159/000024169.
- [16] Antonia, S. J., J. A. Lopez-Martin, J. Bendell, P. A. Ott, M. Taylor, J. P. Eder, D. Jager, M. C. Pietanza, D. T. Le, Braud F. de, M. A. Morse, P. A. Ascierto, L. Horn, A. Amin, R. N. Pillai, J. Evans, I. Chau, P. Bono, A. Atmaca, P. Sharma, C. T. Harbison, C. S. Lin, O. Christensen, and E. Calvo. 2016. "Nivolumab alone and nivolumab plus ipilimumab in recurrent small-cell lung cancer: a multicentre, open-label, phase 1/2 trial." *Lancet Oncol.* 17 (7):883-895.
- [17] ARC & INCa. 2013. *Rôle du microenvironnement dans la tumorigènese et la progression tumorale.*
- [18] Arenberg, D. A., S. L. Kunkel, P. J. Polverini, S. B. Morris, M. D. Burdick, M. C. Glass, D. T. Taub, M. D. Iannettoni, R. I. Whyte, and R. M. Strieter. 1996. "Interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10) is an angiostatic factor that inhibits human non-small cell lung cancer (NSCLC) tumorigenesis and spontaneous metastases." *J Exp Med* 184 (3):981-92.
- [19] Arvelo, F., F. Sojo, and C. Cotte. 2016. "Tumour progression and metastasis." *Ecancermedicalscience.* 10:617.
- [20] Baggiolini, M. 2015. "CXCL8 – The First Chemokine." *Front Immunol* 6. doi: 10.3389/fimmu.2015.00285.
- [21] Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser. 1997. "Human chemokines: an update." *Annu Rev Immunol* 15:675-705. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.675.
- [22] Balda, M. S., and J. M. Anderson. 1993. "Two classes of tight junctions are revealed by ZO-1 isoforms." *Am J Physiol* 264 (4 Pt 1):C918-24. doi: 10.1152/ajpcell.1993.264.4.C918.
- [23] Balda, M. S., M. D. Garrett, and K. Matter. 2003. "The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density." *J Cell Biol* 160 (3):423-32. doi: 10.1083/jcb.200210020.
- [24] Balda, M. S., and K. Matter. 2000. "Transmembrane proteins of tight junctions." *Semin Cell Dev Biol* 11 (4):281-9. doi: 10.1006/scdb.2000.0177.
- [25] Balkwill, F. 2004. "Cancer and the chemokine network." *Nat Rev Cancer* 4 (7):540-50. doi: 10.1038/nrc1388.
- [26] Barrallo-Gimeno, A., and M. A. Nieto. 2005. "The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer." *Development* 132 (14):3151-61. doi: 10.1242/dev.01907.
- [27] Bauer, H., J. Zweimueller-Mayer, P. Steinbacher, A. Lametschwandtner, and H. C. Bauer. 2010. "The dual role of zonula occludens (ZO) proteins." *J Biomed Biotechnol* 2010:402593. doi: 10.1155/2010/402593.
- [28] Bax, N. A., D. A. Pijnappels, A. A. van Oorschot, E. M. Winter, A. A. de Vries, J. van Tuyn, J. Braun, S. Maas, M. J. Schalij, D. E. Atsma, M. J. Goumans, and A. C. Gittenberger-de Groot. 2011. "Epithelial-to-mesenchymal transformation alters electrical conductivity of human epicardial cells." *J Cell Mol Med* 15 (12):2675-83. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01266.x.
- [29] Bazan, J. F., K. B. Bacon, G. Hardiman, W. Wang, K. Soo, D. Rossi, D. R. Greaves, A. Zlotnik, and T. J. Schall. 1997. "A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif." *Nature* 385 (6617):640-4. doi: 10.1038/385640a0.

- [30] Berx, G., and F. van Roy. 2009. "Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1 (6):a003129. doi: 10.1101/cshperspect.a003129.
- [31] Betanzos, A., M. Huerta, E. Lopez-Bayghen, E. Azuara, J. Amerena, and L. Gonzalez-Mariscal. 2004. "The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells." *Exp Cell Res* 292 (1):51-66.
- [32] Beutheu Youmba, S., L. Belmonte, L. Galas, N. Boukhattala, C. Bole-Feysot, P. Dechelotte, and M. Coeffier. 2012. "Methotrexate modulates tight junctions through NF-kappaB, MEK, and JNK pathways." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 54 (4):463-70. doi: 10.1097/MPG.0b013e318247240d.
- [33] Binder-Foucard, F., A. Belot, P. Delafosse, L. Remontet, A. S. Woronoff, and N. Bossard. 2013. Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Partie 1 - Tumeurs solides.
- [34] Bingle, L., N. J. Brown, and C. E. Lewis. 2002. "The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies." *J Pathol* 196 (3):254-65. doi: 10.1002/path.1027.
- [35] Bièche, Ivan, Carine Chavey, Catherine Andrieu, Muriel Busson, Sophie Vacher, Ludovic Le Corre, Jean-Marc Guinebretière, Sandrine Burlinchon, Rosette Lidereau, and Gwendal Lazennec. 2007. "CXC chemokines located in the 4q21 region are up-regulated in breast cancer." doi: 10.1677/erc.1.01301.
- [36] Blach-Olszewska, Z. 2005. "Innate immunity: cells, receptors, and signaling pathways." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 53 (3):245-53.
- [37] Bonneville, M., and E. Scotet. 2006. "Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors." *Curr Opin Immunol* 18 (5):539-46. doi: 10.1016/j.coi.2006.07.002.
- [38] Bonnomet, A., A. Brysse, A. Tachsidis, M. Waltham, E. W. Thompson, M. Polette, and C. Gilles. 2010. "Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15 (2):261-73. doi: 10.1007/s10911-010-9174-0.
- [39] Bonnomet, A., M. Polette, K. Strumane, C. Gilles, V. Dalstein, C. Kileztky, G. Berx, F. van Roy, P. Birembaut, and B. Nawrocki-Raby. 2008. "The E-cadherin-repressed hNanos1 gene induces tumor cell invasion by upregulating MT1-MMP expression." *Oncogene* 27 (26):3692-9. doi: 10.1038/sj.onc.1211035.
- [40] Bonnomet, A., L. Syne, A. Brysse, E. Feyereisen, E. W. Thompson, A. Noel, J. M. Foidart, P. Birembaut, M. Polette, and C. Gilles. 2012. "A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer." *Oncogene* 31 (33):3741-53. doi: 10.1038/onc.2011.540.
- [41] Boolell, V., M. Alamgeer, D. N. Watkins, and V. Ganju. 2015. "The Evolution of Therapies in Non-Small Cell Lung Cancer." *Cancers.(Basel)* 7 (3):1815-1846.
- [42] Boon, T., P.G. Coulie, and B. Van den Eynde. 1997. "Tumor antigens recognized by T cells." *Immunology Today* 18 (6):267-268. doi: 10.1016/S0167-5699(97)80020-5.
- [43] Bourcy, M., M. Suarez-Carmona, J. Lambert, M. E. Francart, H. Schroeder, C. Delierneux, N. Skrypek, E. W. Thompson, G. Jerusalem, G. Berx, M. Thiry, S. Blacher, B. G. Hollier, A. Noel, C. Oury, M. Polette, and C. Gilles. 2016. "Tissue Factor Induced by Epithelial-Mesenchymal Transition Triggers a Procoagulant State That Drives Metastasis of Circulating Tumor Cells." *Cancer Res* 76 (14):4270-82. doi: 10.1158/0008-5472.can-15-2263.
- [44] Bravo-Cordero, J. J., L. Hodgson, and J. Condeelis. 2012. "Directed cell invasion and migration during metastasis." *Curr Opin Cell Biol* 24 (2):277-83. doi: 10.1016/j.ceb.2011.12.004.

- [45] Brennan, P., P. Hainaut, and P. Boffetta. 2011. "Genetics of lung-cancer susceptibility." *Lancet Oncol.* 12 (4):399-408.
- [46] Brysse, A., M. Mestdagt, M. Polette, E. Luczka, W. Hunziker, A. Noel, P. Birembaut, J. M. Foidart, and C. Gilles. 2012. "Regulation of CXCL8/IL-8 expression by zonula occludens-1 in human breast cancer cells." *Mol Cancer Res* 10 (1):121-32. doi: 10.1158/1541-7786.mcr-11-0180.
- [47] Burteau, C., L. Willems, and R. Kettmann. 2007. Les chémokines et leurs récepteurs : rôle dans les infections virales et dans les pathologies cancéreuses.
- [48] Caligiuri, Michael A. 2008. "Human natural killer cells." doi: 10.1182/blood-2007-09-077438.
- [49] Cano, A., M. A. Perez-Moreno, I. Rodrigo, A. Locascio, M. J. Blanco, M. G. del Barrio, F. Portillo, and M. A. Nieto. 2000. "The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression." *Nat Cell Biol* 2 (2):76-83. doi: 10.1038/35000025.
- [50] Capelletti, M., F. Gelsomino, and M. Tiseo. 2014. "MET and ALK as targets for the treatment of NSCLC." *Curr.Pharm.Des* 20 (24):3914-3932.
- [51] Catros, V., O. Toutirais, F. Bouet, F. Cabillic, M. Desille, and JJ. Fournié. 2010. "Lymphocytes Tγδ en cancérologie - Des lymphocytes tueurs non conventionnels." *médecine/sciences* 26 (2):185-192. doi: 10.1051/medsci/2010262185.
- [52] CEP. 2017. "Tumeurs du poumon, primitives et secondaires." *Collège des Enseignants de Pneumologie* Item 306.
- [53] Chae, Y. K., S. Chang, T. Ko, J. Anker, S. Agte, W. Iams, W. M. Choi, K. Lee, and M. Cruz. 2018. "Epithelial-mesenchymal transition (EMT) signature is inversely associated with T-cell infiltration in non-small cell lung cancer (NSCLC)." *Sci Rep* 8 (1):2918. doi: 10.1038/s41598-018-21061-1.
- [54] Charles A Janeway, Jr, Paul Travers, Mark Walport, and Mark J Shlomchik. 2001. "Principles of innate and adaptive immunity." doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27090/>.
- [55] Chater, A. 2014. "Cancer broncho-pulmonaire et thérapeutique." Université de Abou Bekr Belkaid.
- [56] Chevolet, I., R. Speeckaert, M. Schreuer, B. Neyns, O. Krysko, C. Bachert, M. Van Gele, N. van Geel, and L. Brochez. 2015. "Clinical significance of plasmacytoid dendritic cells and myeloid-derived suppressor cells in melanoma." *J Transl Med* 13:9. doi: 10.1186/s12967-014-0376-x.
- [57] Chlenski, A., K. V. Ketels, G. I. Korovaitseva, M. S. Talamonti, R. Oyasu, and D. G. Scarpelli. 2000. "Organization and expression of the human zo-2 gene (tjp-2) in normal and neoplastic tissues." *Biochim Biophys Acta* 1493 (3):319-24.
- [58] Chlenski, A., K. V. Ketels, M. S. Tsao, M. S. Talamonti, M. R. Anderson, R. Oyasu, and D. G. Scarpelli. 1999. "Tight junction protein ZO-2 is differentially expressed in normal pancreatic ducts compared to human pancreatic adenocarcinoma." *Int J Cancer* 82 (1):137-44.
- [59] Chow, M. T., and A. D. Luster. 2014. "Chemokines in cancer." *Cancer Immunol Res* 2 (12):1125-31. doi: 10.1158/2326-6066.cir-14-0160.
- [60] Christiani, D. C. 2009. "Lung cancer genetics: a family affair?" *Clin.Cancer Res.* 15 (8):2581-2582.

- [61] Chun, M. G., and D. Hanahan. 2010. "Genetic deletion of the desmosomal component desmoplakin promotes tumor microinvasion in a mouse model of pancreatic neuroendocrine carcinogenesis." *PLoS Genet* 6 (9):e1001120. doi: 10.1371/journal.pgen.1001120.
- [62] CIRC. 2013. Dernières statistiques mondiales sur le cancer.
- [63] Cochaud, S., J. Giustiniani, C. Thomas, E. Laprevotte, C. Garbar, A. M. Savoye, H. Cure, C. Mascaux, G. Alberici, N. Bonnefoy, J. F. Eliaou, A. Bensussan, and J. Bastid. 2013. "IL-17A is produced by breast cancer TILs and promotes chemoresistance and proliferation through ERK1/2." *Sci Rep* 3:3456. doi: 10.1038/srep03456.
- [64] Cohen, G. B., R. Ren, and D. Baltimore. 1995. "Modular binding domains in signal transduction proteins." *Cell* 80 (2):237-48.
- [65] Colas, E., C. Perez, S. Cabrera, N. Pedrola, M. Monge, J. Castellvi, F. Eyzaguirre, J. Gregorio, A. Ruiz, M. Llaurodo, M. Rigau, M. Garcia, T. Ertekin, M. Montes, R. Lopez-Lopez, R. Carreras, J. Xercavins, A. Ortega, T. Maes, E. Rosell, A. Doll, M. Abal, J. Reventos, and A. Gil-Moreno. 2011. "Molecular markers of endometrial carcinoma detected in uterine aspirates." *Int J Cancer* 129 (10):2435-44. doi: 10.1002/ijc.25901.
- [66] Comerford, I., S. Milasta, V. Morrow, G. Milligan, and R. Nibbs. 2006. "The chemokine receptor CCX-CKR mediates effective scavenging of CCL19 in vitro." *Eur J Immunol* 36 (7):1904-16. doi: 10.1002/eji.200535716.
- [67] Comerford, I., and R. J. Nibbs. 2005. "Post-translational control of chemokines: a role for decoy receptors?" *Immunol Lett* 96 (2):163-74. doi: 10.1016/j.imlet.2004.08.018.
- [68] CoPath. 2012. Histoire naturelle du cancer.
- [69] Cortez-Retamozo, V., M. Etzrodt, A. Newton, P. J. Rauch, A. Chudnovskiy, C. Berger, R. J. Ryan, Y. Iwamoto, B. Marinelli, R. Gorbатов, R. Forghani, T. I. Novobrantseva, V. Koteliensky, J. L. Figueiredo, J. W. Chen, D. G. Anderson, M. Nahrendorf, F. K. Swirski, R. Weissleder, and M. J. Pittet. 2012. "Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (7):2491-6. doi: 10.1073/pnas.1113744109.
- [70] Coté, M. L., M. Liu, S. Bonassi, M. Neri, A. G. Schwartz, D. C. Christiani, M. R. Spitz, J. E. Muscat, G. Rennert, K. K. Aben, A. S. Andrew, V. Bencko, and *et al.* 2012. "Increased risk of lung cancer in individuals with a family history of the disease: A pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium." *Eur.J.Cancer* 48 (13):1957-1968.
- [71] Cowppli-Bony, A., Z. Uhry, L. Remontet, N. Voirin, A. V. Guizard, B. Tretarre, A. M. Bouvier, M. Colonna, N. Bossard, A. S. Woronoff, and P. Grosclaude. 2017. "Survival of solid cancer patients in France, 1989-2013: a population-based study." *Eur.J.Cancer Prev.* 26 (6):461-468.
- [72] Cui, Z., and Y. Hu. 2016. "MicroRNA-124 suppresses Slug-mediated lung cancer metastasis." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 20 (18):3802-3811.
- [73] Curiel, T. J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J. R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M. L. Disis, K. L. Knutson, L. Chen, and W. Zou. 2004. "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." *Nat Med* 10 (9):942-9. doi: 10.1038/nm1093.
- [74] Cyster, J. G. 1999. "Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs." *Science* 286 (5447):2098-102.

- [75] D'Atri, F., F. Nadalutti, and S. Citi. 2002. "Evidence for a functional interaction between cingulin and ZO-1 in cultured cells." *J Biol Chem* 277 (31):27757-64. doi: 10.1074/jbc.M203717200.
- [76] Dai, X., Z. Mao, J. Huang, S. Xie, and H. Zhang. 2013. "The CXCL12/CXCR4 autocrine loop increases the metastatic potential of non-small cell lung cancer in vitro." In *Oncol Lett*, 277-82.
- [77] Dalgarno, D. C., M. C. Botfield, and R. J. Rickles. 1997. "SH3 domains and drug design: ligands, structure, and biological function." *Biopolymers* 43 (5):383-400. doi: 10.1002/(sici)1097-0282(1997)43:5<383::aid-bip4>3.0.co;2-r.
- [78] Dauphin, M., C. Barbe, S. Lemaire, B. Nawrocki-Raby, E. Lagonotte, G. Delepine, P. Birembaut, C. Gilles, and M. Polette. 2013. "Vimentin expression predicts the occurrence of metastases in non small cell lung carcinomas." *Lung Cancer* 81 (1):117-22. doi: 10.1016/j.lungcan.2013.03.011.
- [79] David, J. M., C. Dominguez, D. H. Hamilton, and C. Palena. 2016. "The IL-8/IL-8R Axis: A Double Agent in Tumor Immune Resistance." *Vaccines (Basel)* 4 (3). doi: 10.3390/vaccines4030022.
- [80] De Craene, B., and G. Berx. 2013. "Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression." *Nat Rev Cancer* 13 (2):97-110. doi: 10.1038/nrc3447.
- [81] De Larco, J. E., B. R. K. Wuertz, K. A. Rosner, S. A. Erickson, D. E. Gamache, J. C. Manivel, and L. T. Furcht. 2001. "A Potential Role for Interleukin-8 in the Metastatic Phenotype of Breast Carcinoma Cells." In *Am J Pathol*, 639-46.
- [82] de Mendoza, A., H. Suga, and I. Ruiz-Trillo. 2010. "Evolution of the MAGUK protein gene family in premetazoan lineages." *BMC Evol Biol* 10:93. doi: 10.1186/1471-2148-10-93.
- [83] Dekky, B., M. Ruff, D. Bonnier, V. Legagneux, and N. Theret. 2018. "Proteomic screening identifies the zonula occludens protein ZO-1 as a new partner for ADAM12 in invadopodia-like structures." *Oncotarget* 9 (30):21366-21382. doi: 10.18632/oncotarget.25106.
- [84] Dela Cruz, C. S., L. T. Tanoue, and R. A. Matthay. 2011. "Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention." *Clin.Chest Med.* 32 (4):605-644.
- [85] Della Corte, C. M., G. Viscardi, Liello R. Di, M. Fasano, E. Martinelli, T. Troiani, F. Ciardiello, and F. Morgillo. 2018. "Role and targeting of anaplastic lymphoma kinase in cancer." *Mol.Cancer* 17 (1):30.
- [86] Deryugina, Elena I., Ewa Zajac, Anna Juncker-Jensen, Tatyana A. Kupriyanova, Lisa Welter, and James P. Quigley. 2014. "Tissue-Infiltrating Neutrophils Constitute the Major In Vivo Source of Angiogenesis-Inducing MMP-9 in the Tumor Microenvironment." *Neoplasia* 16 (10):771-788. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.08.013>.
- [87] Deshmane, S. L., S. Kremlev, S. Amini, and B. E. Sawaya. 2009. "Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview." In *J Interferon Cytokine Res*, 313-26.
- [88] Detterbeck, F. C. 2018. "The eighth edition TNM stage classification for lung cancer: What does it mean on main street?" *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 155 (1):356-359.
- [89] Drake, J. M., G. Strohbehn, T. B. Bair, J. G. Moreland, and M. D. Henry. 2009. "ZEB1 enhances transendothelial migration and represses the epithelial phenotype of prostate cancer cells." *Mol Biol Cell* 20 (8):2207-17. doi: 10.1091/mbc.E08-10-107610.1091/mbc.e08-10-1076.
- [90] Duchemann, B., L. Friboulet, and B. Besse. 2015. "Therapeutic management of ALK+ nonsmall cell lung cancer patients." *Eur.Respir.J.* 46 (1):230-242.

- [91] Ebnet, K., C. U. Schulz, M. K. Meyer Zu Brickwedde, G. G. Pendl, and D. Vestweber. 2000. "Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1." *J Biol Chem* 275 (36):27979-88. doi: 10.1074/jbc.M002363200.
- [92] ESMO. 2017. Cancer du poumon non à petites cellules.
- [93] Fang, F., W. Xiao, and Z. Tian. 2017. "NK cell-based immunotherapy for cancer." *Semin Immunol* 31:37-54. doi: 10.1016/j.smim.2017.07.009.
- [94] Fanning, A. S., B. P. Little, C. Rahner, D. Utepbergenov, Z. Walther, and J. M. Anderson. 2007. "The unique-5 and -6 motifs of ZO-1 regulate tight junction strand localization and scaffolding properties." *Mol Biol Cell* 18 (3):721-31. doi: 10.1091/mbc.e06-08-0764.
- [95] Fernando, R. I., D. H. Hamilton, C. Dominguez, J. M. David, K. K. McCampbell, and C. Palena. 2016. "IL-8 signaling is involved in resistance of lung carcinoma cells to erlotinib." *Oncotarget* 7 (27):42031-42044. doi: 10.18632/oncotarget.9662.
- [96] Field, R. W., and B. L. Withers. 2012. "Occupational and environmental causes of lung cancer." *Clin.Chest Med.* 33 (4):681-703.
- [97] Fink, C., R. Weigel, T. Hembes, H. Lauke-Wettwer, S. Kliesch, M. Bergmann, and R. H. Brehm. 2006. "Altered expression of ZO-1 and ZO-2 in Sertoli cells and loss of blood-testis barrier integrity in testicular carcinoma in situ." *Neoplasia* 8 (12):1019-27. doi: 10.1593/neo.06559.
- [98] Fischer, K. R., A. Durrans, S. Lee, J. Sheng, F. Li, S. T. Wong, H. Choi, T. El Rayes, S. Ryu, J. Troeger, R. F. Schwabe, L. T. Vahdat, N. K. Altorki, V. Mittal, and D. Gao. 2015. "Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance." *Nature* 527 (7579):472-6. doi: 10.1038/nature15748.
- [99] Fischer, R. S., and M. P. Quinlan. 1998. "The C terminus of E1A regulates tumor progression and epithelial cell differentiation." *Virology* 249 (2):427-39. doi: 10.1006/viro.1998.9337.
- [100] Fluge, O., D. R. Haugen, J. R. Lillehaug, and J. E. Varhaug. 2001. "Difference in patterns of Met expression in papillary thyroid carcinomas and nonneoplastic thyroid tissue." *World J Surg* 25 (5):623-31. doi: 10.1007/s002680020167.
- [101] Fouad, Y. A., and C. Aanei. 2017. "Revisiting the hallmarks of cancer." *Am.J.Cancer Res.* 7 (5):1016-1036.
- [102] Francart, M. E., J. Lambert, A. M. Vanwysberghe, E. W. Thompson, M. Bourcy, M. Polette, and C. Gilles. 2018. "Epithelial-mesenchymal plasticity and circulating tumor cells: Travel companions to metastases." *Dev Dyn* 247 (3):432-450. doi: 10.1002/dvdy.24506.
- [103] Frantz, C., K. M. Stewart, and V. M. Weaver. 2010. "The extracellular matrix at a glance." *J Cell Sci* 123 (Pt 24):4195-200. doi: 10.1242/jcs.023820.
- [104] Fridlender, Zvi G., Jing Sun, Samuel Kim, Veena Kapoor, Guanjun Cheng, Leona Ling, G. Scott Worthen, and Steven M. Albelda. 2009. "Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : "N1" versus "N2" TAN." *Cancer Cell* 16 (3):183-194. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.06.017>.
- [105] Furth, R.V., M. M. C. Diesselhoff-den Dulk, and H. Mattie. 1973. "Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction." doi: 10.1084/jem.138.6.1314.

- [106] Gabrilovich, D. I., and S. Nagaraj. 2009. "Myeloid-derived-suppressor cells as regulators of the immune system." *Nat Rev Immunol* 9 (3):162-74. doi: 10.1038/nri2506.
- [107] Galdiero, M. R., G. Varricchi, S. Loffredo, A. Mantovani, and G. Marone. 2018. "Roles of neutrophils in cancer growth and progression." *J Leukoc Biol* 103 (3):457-464. doi: 10.1002/jlb.3mr0717-292r.
- [108] Gandini, S., E. Botteri, S. Iodice, M. Boniol, A. B. Lowenfels, P. Maisonneuve, and P. Boyle. 2008. "Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis." *Int.J.Cancer* 122 (1):155-164.
- [109] Gasteiger, G., A. D'Ostualdo, D. A. Schubert, A. Weber, E. M. Bruscia, and D. Hartl. 2017. "Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players." *J Innate Immun* 9 (2):111-125. doi: 10.1159/000453397.
- [110] Geneste, O., A. M. Camus, M. Castegnaro, S. Petruzzelli, P. Macchiarini, C. A. Angeletti, C. Giuntini, and H. Bartsch. 1991. "Comparison of pulmonary DNA adduct levels, measured by 32P-postlabelling and aryl hydrocarbon hydroxylase activity in lung parenchyma of smokers and ex-smokers." *Carcinogenesis* 12 (7):1301-1305.
- [111] Gheldof, A., and G. Berx. 2013. "Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition." *Prog Mol Biol Transl Sci* 116:317-36. doi: 10.1016/b978-0-12-394311-8.00014-5.
- [112] Gialeli, C., A. D. Theocharis, and N. K. Karamanos. 2011. "Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting." *Febs j* 278 (1):16-27. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x.
- [113] Gilles, C., M. Polette, J. M. Zahm, J. M. Tournier, L. Volders, J. M. Foidart, and P. Birembaut. 1999. "Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration." *J Cell Sci* 112 (Pt 24):4615-25.
- [114] Gonzalez-Mariscal, L., P. Bautista, S. Lechuga, and M. Quiros. 2012. "ZO-2, a tight junction scaffold protein involved in the regulation of cell proliferation and apoptosis." *Ann N Y Acad Sci* 1257:133-41. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06537.x.
- [115] Gonzalez-Mariscal, L., A. Betanzos, and A. Avila-Flores. 2000. "MAGUK proteins: structure and role in the tight junction." *Semin Cell Dev Biol* 11 (4):315-24. doi: 10.1006/scdb.2000.0178.
- [116] Gonzalez-Mariscal, L., A. Betanzos, P. Nava, and B. E. Jaramillo. 2003. "Tight junction proteins." *Prog Biophys Mol Biol* 81 (1):1-44.
- [117] Gonzalez-Mariscal, L., A. Dominguez-Calderon, A. Raya-Sandino, J. M. Ortega-Olvera, O. Vargas-Sierra, and G. Martinez-Revollar. 2014. "Tight junctions and the regulation of gene expression." *Semin Cell Dev Biol* 36:213-23. doi: 10.1016/j.semcd.2014.08.009.
- [118] Gonzalez-Mariscal, L., S. Islas, R. G. Contreras, M. R. Garcia-Villegas, A. Betanzos, J. Vega, A. Diaz-Quinonez, N. Martin-Orozco, V. Ortiz-Navarrete, M. Cereijido, and J. Valdes. 1999. "Molecular characterization of the tight junction protein ZO-1 in MDCK cells." *Exp Cell Res* 248 (1):97-109.
- [119] Gonzalez-Mariscal, L., S. Lechuga, and E. Garay. 2007. "Role of tight junctions in cell proliferation and cancer." *Prog Histochem Cytochem* 42 (1):1-57. doi: 10.1016/j.proghi.2007.01.001.
- [120] Gonzalez-Mariscal, L., J. Miranda, JM. Ortega-Olvera, H. Gallego-Glutierrez, A. Raya-Sandino, and O. Vargas-Sierra. 2016. "Zonula Occludens Proteins in Cancer." 4 (3):107-116. doi: 10.1007/s40139-016-0109-3.
- [121] Gonzalez-Mariscal, L., A. Ponce, L. Alarcon, and B. E. Jaramillo. 2006. "The tight junction protein ZO-2 has several functional nuclear export signals." *Exp Cell Res* 312 (17):3323-35. doi: 10.1016/j.yexcr.2006.07.006.

- [122] Gonzalez-Mariscal, L., R. Tapia, and D. Chamorro. 2008. "Crosstalk of tight junction components with signaling pathways." *Biochim Biophys Acta* 1778 (3):729-56. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.08.018.
- [123] Gonzalez-Martin, A., L. Gomez, J. Lustgarten, E. Mira, and S. Manes. 2011. "Maximal T cell-mediated antitumor responses rely upon CCR5 expression in both CD4(+) and CD8(+) T cells." *Cancer Res* 71 (16):5455-66. doi: 10.1158/0008-5472.can-11-1687.
- [124] Gottardi, C. J., M. Arpin, A. S. Fanning, and D. Louvard. 1996. "The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (20):10779-84.
- [125] Gougerot-Pocidallo, MA., J. El Benna, P. My-Chan Dang, and C. Elbim. 2007. "Quand les polynucléaires neutrophiles attrapent les agents pathogènes dans leurs filets." *médecine/sciences* 23 (5):464-465. doi: 10.1051/medsci/2007235464.
- [126] Gregory, A. D., and A. M. Houghton. 2011. "Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy." *Cancer Res* 71 (7):2411-6. doi: 10.1158/0008-5472.can-10-2583.
- [127] Guillerey, C., N.D. Huntington, and M.J. Smyth. 2016. "Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy." *Nature Immunology* 17 (9):1025. doi: doi:10.1038/ni.3518.
- [128] Gumbiner, B., T. Lowenkopf, and D. Apatira. 1991. "Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (8):3460-4.
- [129] Gupta, P. C., J. M. Rice, V. Wünsch-Filho, J. Friberg, P. Eriksson, K. Husgafvel-Pursiainen, H. Norppa, H. Bartsch, J. Chang-Claude, and *et al.* 2009. *A review of human carcinogens - Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish.*
- [130] Ha, H., B. Debnath, and N. Neamati. 2017. "Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases." *Theranostics* 7 (6):1543-1588. doi: 10.7150/thno.15625.
- [131] Hajra, K. M., D. Y. Chen, and E. R. Fearon. 2002. "The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer." *Cancer Res* 62 (6):1613-8.
- [132] Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2000. "The hallmarks of cancer." *Cell* 100 (1):57-70.
- [133] Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* 144 (5):646-674.
- [134] Hartsock, A., and W. J. Nelson. 2008. "Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton." *Biochim Biophys Acta* 1778 (3):660-9. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.07.012.
- [135] Haskins, J., L. Gu, E. S. Wittchen, J. Hibbard, and B. R. Stevenson. 1998. "ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin." *J Cell Biol* 141 (1):199-208.
- [136] Hay, E. D. 2005. "The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it." *Dev.Dyn.* 233 (3):706-720.
- [137] He, L., X. He, L. P. Lim, Stanchina E. de, Z. Xuan, Y. Liang, W. Xue, L. Zender, J. Magnus, D. Ridzon, A. L. Jackson, P. S. Linsley, C. Chen, S. W. Lowe, M. A. Cleary, and G. J. Hannon. 2007. "A microRNA component of the p53 tumour suppressor network." *Nature* 447 (7148):1130-1134.
- [138] Hensbergen, P. J., P. G. Wijnands, M. W. Schreurs, R. J. Scheper, R. Willemze, and C. P. Tensen. 2005. "The CXCR3 targeting chemokine CXCL11 has potent antitumor activity in vivo involving

- attraction of CD8+ T lymphocytes but not inhibition of angiogenesis." *J Immunother* 28 (4):343-51.
- [139] Hoerning, A., K. Koss, D. Datta, L. Boneschansker, C. N. Jones, I. Y. Wong, D. Irimia, K. Calzadilla, F. Benitez, P. F. Hoyer, W. E. Harmon, and D. M. Briscoe. 2011. "Subsets of human CD4(+) regulatory T cells express the peripheral homing receptor CXCR3." *Eur J Immunol* 41 (8):2291-302. doi: 10.1002/eji.201041095.
- [140] Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." *Science* 299 (5609):1057-61. doi: 10.1126/science.1079490.
- [141] Howarth, A. G., M. R. Hughes, and B. R. Stevenson. 1992. "Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other nonepithelial cell types." *Am J Physiol* 262 (2 Pt 1):C461-9. doi: 10.1152/ajpcell.1992.262.2.C461.
- [142] Hulpiau, P., and F. van Roy. 2009. "Molecular evolution of the cadherin superfamily." *Int J Biochem Cell Biol* 41 (2):349-69. doi: 10.1016/j.biocel.2008.09.027.
- [143] Hung, R. J., P. Boffetta, J. Brockmoller, D. Butkiewicz, I. Cascorbi, M. L. Clapper, S. Garte, A. Haugen, A. Hirvonen, S. Anttila, I. Kalina, Marchand L. Le, S. J. London, A. Rannug, M. Romkes, J. Salagovic, B. Schoket, L. Gaspari, and E. Taioli. 2003. "CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms and lung cancer risk in Caucasian non-smokers: a pooled analysis." *Carcinogenesis* 24 (5):875-882.
- [144] Hung, R. J., J. D. McKay, V. Gaborieau, P. Boffetta, M. Hashibe, D. Zaridze, A. Mukeria, N. Szeszenia-Dabrowska, J. Lissowska, P. Rudnai, E. Fabianova, D. Mates, V. Bencko, L. Foretova, V. Janout, C. Chen, G. Goodman, J. K. Field, T. Liloglou, G. Xinarianos, A. Cassidy, J. McLaughlin, G. Liu, S. Narod, H. E. Krokan, F. Skorpen, M. B. Elvestad, K. Hveem, L. Vatten, J. Linseisen, F. Clavel-Chapelon, P. Vineis, H. B. Bueno-de-Mesquita, E. Lund, C. Martinez, S. Bingham, T. Rasmuson, P. Hainaut, E. Riboli, W. Ahrens, S. Benhamou, P. Lagiou, D. Trichopoulos, I. Holcatova, F. Merletti, K. Kjaerheim, A. Agudo, G. Macfarlane, R. Talamini, L. Simonato, R. Lowry, D. I. Conway, A. Znaor, C. Healy, D. Zelenika, A. Boland, M. Delepine, M. Foglio, D. Lechner, F. Matsuda, H. Blanche, I. Gut, S. Heath, M. Lathrop, and P. Brennan. 2008. "A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25." *Nature* 452 (7187):633-637.
- [145] Hynes, R. O. 2009. "The extracellular matrix: not just pretty fibrils." *Science* 326 (5957):1216-9. doi: 10.1126/science.1176009.
- [146] IARC. 2004. *Tobacco Smoke and Involuntary Smoking*.
- [147] Iba, T., N. Hashiguchi, I. Nagaoka, Y. Tabe, and M. Murai. 2013. "Neutrophil cell death in response to infection and its relation to coagulation." In *J Intensive Care*.
- [148] Ikenouchi, J., K. Umeda, S. Tsukita, and M. Furuse. 2007. "Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization." *J Cell Biol* 176 (6):779-86. doi: 10.1083/jcb.200612080.
- [149] Imamichi, Y., and A. Menke. 2007. "Signaling pathways involved in collagen-induced disruption of the E-cadherin complex during epithelial-mesenchymal transition." *Cells Tissues Organs* 185 (1-3):180-90. doi: 10.1159/000101319.
- [150] INCa. 2010a. Cancers et tabagisme passif.
- [151] INCa. 2010b. Survie attendue des patients atteints de cancers en France.
- [152] INCa. 2011a. Cancers et tabac.

- [153] INCa. 2011b. Radon et Cancer.
- [154] Isidro, Raymond A., and Caroline B. Appleyard. 2016. "Colonic macrophage polarization in homeostasis, inflammation, and cancer." <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00123.2016>. doi: 10.1152/ajpgi.00123.2016.
- [155] Islas, S., J. Vega, L. Ponce, and L. Gonzalez-Mariscal. 2002. "Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells." *Exp Cell Res* 274 (1):138-48. doi: 10.1006/excr.2001.5457.
- [156] Itoh, M., M. Furuse, K. Morita, K. Kubota, M. Saitou, and S. Tsukita. 1999. "Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins." *J Cell Biol* 147 (6):1351-63.
- [157] Itoh, M., A. Nagafuchi, S. Moroi, and S. Tsukita. 1997. "Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments." *J Cell Biol* 138 (1):181-92.
- [158] Itoh, M., A. Nagafuchi, S. Yonemura, T. Kitani-Yasuda, and S. Tsukita. 1993. "The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy." *J Cell Biol* 121 (3):491-502.
- [159] Iyevleva, A. G., and E. N. Imyanitov. 2016. "Cytotoxic and targeted therapy for hereditary cancers." *Hered.Cancer Clin.Pract.* 14 (1):17.
- [160] Janne, P. A., C. Li, X. Zhao, L. Girard, T. H. Chen, J. Minna, D. C. Christiani, B. E. Johnson, and M. Meyerson. 2004. "High-resolution single-nucleotide polymorphism array and clustering analysis of loss of heterozygosity in human lung cancer cell lines." *Oncogene* 23 (15):2716-2726.
- [161] Jie, X. X., X. Y. Zhang, and C. J. Xu. 2017. "Epithelial-to-mesenchymal transition, circulating tumor cells and cancer metastasis: Mechanisms and clinical applications." *Oncotarget* 8 (46):81558-81571. doi: 10.18632/oncotarget.18277.
- [162] Johnson, S. M., H. Grosshans, J. Shingara, M. Byrom, R. Jarvis, A. Cheng, E. Labourier, K. L. Reinert, D. Brown, and F. J. Slack. 2005. "RAS is regulated by the let-7 microRNA family." *Cell* 120 (5):635-647.
- [163] Josefowicz, S. Z., L. F. Lu, and A. Y. Rudensky. 2012. "Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function." *Annu Rev Immunol* 30:531-64. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623.
- [164] Joyce, J. A., and J. W. Pollard. 2009. "Microenvironmental regulation of metastasis." *Nat Rev Cancer* 9 (4):239-52. doi: 10.1038/nrc2618.
- [165] Jéhannin-Ligier, K., E. Dantony, N. Bossard, F. Molini,, G. Defosse, L. Daubisse-Marliac, P. Delafosse, L. Remontet, and Z. Uhry. 2017. *Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine en 2017. Rapport technique. Saint-Maurice.*
- [166] Kaihara, T., H. Kawamata, J. Imura, S. Fujii, K. Kitajima, F. Omotehara, N. Maeda, T. Nakamura, and T. Fujimori. 2003. "Redifferentiation and ZO-1 reexpression in liver-metastasized colorectal cancer: possible association with epidermal growth factor receptor-induced tyrosine phosphorylation of ZO-1." *Cancer Sci* 94 (2):166-72.

J

K

- [167] Kaihara, T., T. Kusaka, M. Nishi, H. Kawamata, J. Imura, K. Kitajima, R. Itoh-Minami, N. Aoyama, M. Kasuga, Y. Oda, M. Hattori, and T. Fujimori. 2003. "Dedifferentiation and decreased expression of adhesion molecules, E-cadherin and ZO-1, in colorectal cancer are closely related to liver metastasis." *J Exp Clin Cancer Res* 22 (1):117-23.
- [168] Kalluri, R., and R. A. Weinberg. 2009. "The basics of epithelial-mesenchymal transition." *J.Clin.Invest* 119 (6):1420-1428.
- [169] Kanterman, J., M. Sade-Feldman, and M. Baniyash. 2012. "New insights into chronic inflammation-induced immunosuppression." *Semin Cancer Biol* 22 (4):307-18. doi: 10.1016/j.semcan.2012.02.008.
- [170] Kanwal, M., X. J. Ding, and Y. Cao. 2017. "Familial risk for lung cancer." *Oncol.Lett.* 13 (2):535-542.
- [171] Kapur, J. N., P. K. Sahoo, and A. K. C. Wong. 1985. "A new method for gray-level picture thresholding using the entropy of the histogram." *Computer Vision, Graphics, and Image Processing* 29 (3):273-285. doi: [https://doi.org/10.1016/0734-189X\(85\)90125-2](https://doi.org/10.1016/0734-189X(85)90125-2).
- [172] Karacosta, L., S. Bendall, and S. Plevritis. Dec 2017. Identifying dynamic EMT transition states and constructing a proteomic EMT landscape of lung cancer using single cell multidimensional analysis. *8th International Meeting on Epithelial-Mesenchymal Transition (TEMTIA VIII)*.
- [173] Katsube, T., M. Takahisa, R. Ueda, N. Hashimoto, M. Kobayashi, and S. Togashi. 1998. "Cortactin associates with the cell-cell junction protein ZO-1 in both *Drosophila* and mouse." *J Biol Chem* 273 (45):29672-7.
- [174] Katsuno, T., K. Umeda, T. Matsui, M. Hata, A. Tamura, M. Itoh, K. Takeuchi, T. Fujimori, Y. Nabeshima, T. Noda, and S. Tsukita. 2008. "Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells." *Mol Biol Cell* 19 (6):2465-75. doi: 10.1091/mbc.E07-12-121510.1091/mbc.e07-12-1215.
- [175] Kausalya, P. J., D. C. Phua, and W. Hunziker. 2004. "Association of ARVCF with zonula occludens (ZO)-1 and ZO-2: binding to PDZ-domain proteins and cell-cell adhesion regulate plasma membrane and nuclear localization of ARVCF." *Mol Biol Cell* 15 (12):5503-15. doi: 10.1091/mbc.e04-04-0350.
- [176] Kidd, M. E., D. K. Shumaker, and K. M. Ridge. 2014. "The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer." *Am J Respir Cell Mol Biol* 50 (1):1-6. doi: 10.1165/rcmb.2013-0314TR.
- [177] Kidd, P. 2003. "Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease." *Altern Med Rev* 8 (3):223-46.
- [178] Kim, D. H., T. Xing, Z. Yang, R. Dudek, Q. Lu, and Y. H. Chen. 2017. "Epithelial Mesenchymal Transition in Embryonic Development, Tissue Repair and Cancer: A Comprehensive Overview." *J Clin Med* 7 (1). doi: 10.3390/jcm7010001.
- [179] Kim, E., M. Niethammer, A. Rothschild, Y. N. Jan, and M. Sheng. 1995. "Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases." *Nature* 378 (6552):85-8. doi: 10.1038/378085a0.
- [180] Kim, J., T. Mori, S. L. Chen, F. F. Amersi, S. R. Martinez, C. Kuo, R. R. Turner, X. Ye, A. J. Bilchik, D. L. Morton, and D. S. Hoon. 2006. "Chemokine receptor CXCR4 expression in patients with melanoma and colorectal cancer liver metastases and the association with disease outcome." *Ann Surg* 244 (1):113-20. doi: 10.1097/01.sla.0000217690.65909.9c.
- [181] Kim, K. K., M. C. Kugler, P. J. Wolters, L. Robillard, M. G. Galvez, A. N. Brumwell, D. Sheppard, and H. A. Chapman. 2006. "Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo

- during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103 (35):13180-13185.
- [182] Kim, S., and V. Westeel. 2013. *Le cancer du poumon du non-fumeur*.
- [183] Kleeff, J., X. Shi, H. P. Bode, K. Hoover, S. Shrikhande, P. J. Bryant, M. Korc, M. W. Buchler, and H. Friess. 2001. "Altered expression and localization of the tight junction protein ZO-1 in primary and metastatic pancreatic cancer." *Pancreas* 23 (3):259-65.
- [184] Knights, A. J., A. P. Funnell, M. Crossley, and R. C. Pearson. 2012. "Holding Tight: Cell Junctions and Cancer Spread." *Trends Cancer Res* 8:61-69.
- [185] Koistinen, P., and J. Heino. 2013. "Integrins in Cancer Cell Invasion." doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6070/>.
- [186] Kolaczowska, E., and P. Kubes. 2013. "Neutrophil recruitment and function in health and inflammation." *Nature Reviews Immunology* 13 (3):159. doi: doi:10.1038/nri3399.
- [187] Koreck, A., A. Surányi, B. J. Szöny, Á Farkas, Z. Bata-Csörgö, L. Kemény, and A. Dobozy. 2002. "CD3+CD56+ NK T cells are significantly decreased in the peripheral blood of patients with psoriasis." *Clin Exp Immunol* 127 (1):176-82. doi: 10.1046/j.1365-2249.2002.01721.x.
- [188] Kowalczyk, Andrew P., and Kathleen J. Green. 2013. "Structure, Function and Regulation of Desmosomes." *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 116:95-118. doi: 10.1016/B978-0-12-394311-8.00005-4.
- [189] Kuang, Y., Y. Wu, H. Jiang, and D. Wu. 1996. "Selective G protein coupling by C-C chemokine receptors." *J Biol Chem* 271 (8):3975-8.
- [190] Kudo-Saito, C., H. Shirako, T. Takeuchi, and Y. Kawakami. 2009. "Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells." *Cancer Cell* 15 (3):195-206. doi: 10.1016/j.ccr.2009.01.023.
- [191] Lamagna, C., M. Aurrand-Lions, and B. A. Imhof. 2006. "Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis." *J Leukoc Biol* 80 (4):705-13. doi: 10.1189/jlb.1105656.
- [192] Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck. 2014. "Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition." *Nat Rev Mol Cell Biol* 15 (3):178-96. doi: 10.1038/nrm3758.
- [193] Land, W. G. 2015. "The Role of Damage-Associated Molecular Patterns in Human Diseases: Part I - Promoting inflammation and immunity." *Sultan Qaboos Univ Med J* 15 (1):e9-e21.
- [194] Latorre, I. J., M. H. Roh, K. K. Frese, R. S. Weiss, B. Margolis, and R. T. Javier. 2005. "Viral oncoprotein-induced mislocalization of select PDZ proteins disrupts tight junctions and causes polarity defects in epithelial cells." *J Cell Sci* 118 (Pt 18):4283-93. doi: 10.1242/jcs.02560.
- [195] Le Bitoux, M. A., and I. Stamenkovic. 2008. "Tumor-host interactions: the role of inflammation." *Histochem Cell Biol* 130 (6):1079-90. doi: 10.1007/s00418-008-0527-3.
- [196] Lesage, J., M. Suarez-Carmona, D. Neyrinck-Leglantier, S. Grelet, S. Blacher, W. Hunziker, P. Birembaut, A. Noel, B. Nawrocki-Raby, C. Gilles, and M. Polette. 2017. "Zonula occludens-1/NF-kappaB/CXCL8: a new regulatory axis for tumor angiogenesis." *Faseb j* 31 (4):1678-1688. doi: 10.1096/fj.201600890R.
- [197] Li, Q. Q., J. D. Xu, W. J. Wang, X. X. Cao, Q. Chen, F. Tang, Z. Q. Chen, X. P. Liu, and Z. D. Xu. 2009. "Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells." *Clin Cancer Res* 15 (8):2657-65. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-08-2372.

- [198] Li, R., S. Ong, K. Krysan, L. Tran, S. Park, T. Walser, J. Zhe, and S. Dubinett. 2016. "An epigenetic switch leads to EMT memory in chronic inflammation in non-small cell lung cancer." *Journal of Thoracic Oncology* 11 (2):S30-S31. doi: doi:10.1016/j.jtho.2015.12.051.
- [199] Li, Y. M., S. C. Xu, J. Li, K. Q. Han, H. F. Pi, L. Zheng, G. H. Zuo, X. B. Huang, H. Y. Li, H. Z. Zhao, Z. P. Yu, Z. Zhou, and P. Liang. 2013. "Epithelial-mesenchymal transition markers expressed in circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma patients with different stages of disease." *Cell Death Dis* 4:e831. doi: 10.1038/cddis.2013.347.
- [200] Liu, K., C. Bao, N. Yao, C. Miao, J. Varlotto, Q. Sun, and X. Sun. 2015. "Expression of CXCR4 and non-small cell lung cancer prognosis: a meta-analysis." *Int J Clin Exp Med* 8 (5):7435-45.
- [201] Liu, P., H. G. Vikis, D. Wang, Y. Lu, Y. Wang, A. G. Schwartz, S. M. Pinney, P. Yang, Andrade M. de, G. M. Petersen, J. S. Wiest, P. R. Fain, A. Gazdar, C. Gaba, H. Rothschild, D. Mandal, T. Coons, J. Lee, E. Kupert, D. Seminara, J. Minna, J. E. Bailey-Wilson, X. Wu, M. R. Spitz, T. Eisen, R. S. Houlston, C. I. Amos, M. W. Anderson, and M. You. 2008. "Familial aggregation of common sequence variants on 15q24-25.1 in lung cancer." *J.Natl.Cancer Inst.* 100 (18):1326-1330.
- [202] Liu, Q., A. Li, Y. Tian, J. D. Wu, Y. Liu, T. Li, Y. Chen, X. Han, and K. Wu. 2016. "The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer." *Cytokine Growth Factor Rev* 31:61-71. doi: 10.1016/j.cytogfr.2016.08.002.
- [203] Locati, M., Y. M. Torre, E. Galliera, R. Bonecchi, H. Bodduluri, G. Vago, A. Vecchi, and A. Mantovani. 2005. "Silent chemoattractant receptors: D6 as a decoy and scavenger receptor for inflammatory CC chemokines." *Cytokine Growth Factor Rev* 16 (6):679-86. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.05.003.
- [204] Lombardi, V. C., S. F. Khaiboullina, and A. A. Rizvanov. 2015. "Plasmacytoid dendritic cells, a role in neoplastic prevention and progression." *Eur J Clin Invest* 45 Suppl 1:1-8. doi: 10.1111/eci.12363.
- [205] Los Alamos National, Laboratory. 2016. *Mutational signatures mark cancer's smoking gun.*
- [206] Lowry, L. E., and W. A. Zehring. 2017. "Potentiation of Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy: A Review of Literature." *Front Immunol* 8. doi: 10.3389/fimmu.2017.01061.
- [207] Luczka, E., L. Syne, B. Nawrocki-Raby, C. Kileztky, W. Hunziker, P. Birembaut, C. Gilles, and M. Polette. 2013. "Regulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression by zonula occludens-2 in human lung cancer cells." *Clin Exp Metastasis* 30 (7):833-43. doi: 10.1007/s10585-013-9583-8.
- [208] Mackay, C. R. 1997. "Chemokines: what chemokine is that?" *Curr Biol* 7 (6):R384-6.
- [209] Mak, Tak W., and Mary E. Saunders. 2006. "Bridging Innate and Adaptive Immunity: NK, $\gamma\delta$ T, and NKT Cells." In *The Immune Response*, edited by Tak W. Mak and Mary E. Saunders, 517-552. Burlington: Academic Press.
- [210] Mann, B., M. Gelos, A. Siedow, M. L. Hanski, A. Gratchev, M. Ilyas, W. F. Bodmer, M. P. Moyer, E. O. Riecken, H. J. Buhr, and C. Hanski. 1999. "Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (4):1603-8.
- [211] Manser, R., G. Wright, D. Hart, G. Byrnes, and D. A. Campbell. 2005. "Surgery for early stage non-small cell lung cancer." *Cochrane.Database.Syst.Rev.* (1):CD004699.
- [212] Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, and M. Locati. 2004. "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." *Trends Immunol* 25 (12):677-86. doi: 10.1016/j.it.2004.09.015.

- [213] Mao, Y., D. Yang, J. He, and M. J. Krasna. 2016. "Epidemiology of Lung Cancer." *Surg.Oncol.Clin.N.Am.* 25 (3):439-445.
- [214] Maquart, F. X., S. Pasco, L. Ramont, W. Hornebeck, and J. C. Monboisse. 2004. "An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity. Implication in tumor invasion." *Crit Rev Oncol Hematol* 49 (3):199-202. doi: 10.1016/j.critrevonc.2003.06.007.
- [215] Marmarelis, M. E., and C. Aggarwal. 2018. "Combination Immunotherapy in Non-small Cell Lung Cancer." *Curr.Oncol.Rep.* 20 (7):55.
- [216] Martin, D., R. Galisteo, and J. S. Gutkind. 2009. "CXCL8/IL8 stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NFkappaB through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) complex." *J Biol Chem* 284 (10):6038-42. doi: 10.1074/jbc.C800207200.
- [217] Martin, T. A., G. Watkins, R. E. Mansel, and W. G. Jiang. 2004. "Loss of tight junction plaque molecules in breast cancer tissues is associated with a poor prognosis in patients with breast cancer." *Eur J Cancer* 40 (18):2717-25. doi: 10.1016/j.ejca.2004.08.008.
- [218] Martini, F. H., M. J. Timmons, and R. B. Tallitsch. 2012. *Human Anatomy (7th edition)*.
- [219] Masiero, M., C. Lucchiari, K. Mazzocco, G. Veronesi, P. Maisonneuve, C. Jemos, E. O. Sale, S. Spina, R. Bertolotti, and G. Pravettoni. 2018. "E-cigarettes May Support Smokers With High Smoking-Related Risk Awareness to Stop Smoking in the Short Run: Preliminary Results by Randomized Controlled Trial." *Nicotine.Tob.Res.*
- [220] Mattagajasingh, S. N., S. C. Huang, J. S. Hartenstein, and E. J. Benz, Jr. 2000. "Characterization of the interaction between protein 4.1R and ZO-2. A possible link between the tight junction and the actin cytoskeleton." *J Biol Chem* 275 (39):30573-85. doi: 10.1074/jbc.M004578200.
- [221] Matter, Karl, and Maria S. Balda. 2003. "Signalling to and from tight junctions." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (3):225. doi: doi:10.1038/nrm1055.
- [222] Maury, S., F. M. Lemoine, Y. Hicheri, M. Rosenzweig, C. Badoual, M. Cherai, J. L. Beaumont, N. Azar, N. Dhedin, A. Sirvent, A. Buzyn, M. T. Rubio, S. Vigouroux, O. Montagne, D. Bories, F. Roudot-Thoraval, J. P. Vernant, C. Cordonnier, D. Klatzmann, and J. L. Cohen. 2010. "CD4+CD25+ regulatory T cell depletion improves the graft-versus-tumor effect of donor lymphocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." *Sci Transl Med* 2 (41):41ra52. doi: 10.1126/scitranslmed.3001302.
- [223] May, Kenneth F., Masahisa Jinushi, and Glenn Dranoff. 2013. "Chapter 8 - Immunosurveillance: Innate and Adaptive Antitumor Immunity." In *Cancer Immunotherapy (Second Edition)*, edited by George C. Prendergast and Elizabeth M. Jaffee, 101-113. San Diego: Academic Press.
- [224] McGee, A. W., S. R. Dakoji, O. Olsen, D. S. Bredt, W. A. Lim, and K. E. Prehoda. 2001. "Structure of the SH3-guanylate kinase module from PSD-95 suggests a mechanism for regulated assembly of MAGUK scaffolding proteins." *Mol Cell* 8 (6):1291-301.
- [225] McGrail, D. J., R. Mezencev, Q. M. Kieu, J. F. McDonald, and M. R. Dawson. 2015. "SNAIL-induced epithelial-to-mesenchymal transition produces concerted biophysical changes from altered cytoskeletal gene expression." *Faseb j* 29 (4):1280-9. doi: 10.1096/fj.14-257345.
- [226] McNeil, E., C. T. Capaldo, and I. G. Macara. 2006. "Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells." *Mol Biol Cell* 17 (4):1922-32. doi: 10.1091/mbc.e05-07-0650.

- [227] Merchant, N., G. P. Nagaraju, B. Rajitha, S. Lammata, K. K. Jella, Z. S. Buchwald, S. S. Lakka, and A. N. Ali. 2017. "Matrix metalloproteinases: their functional role in lung cancer." *Carcinogenesis* 38 (8):766-780. doi: 10.1093/carcin/bgx063.
- [228] Mestdagt, M., M. Polette, G. Buttice, A. Noel, A. Ueda, J. M. Foidart, and C. Gilles. 2006. "Transactivation of MCP-1/CCL2 by beta-catenin/TCF-4 in human breast cancer cells." *Int J Cancer* 118 (1):35-42. doi: 10.1002/ijc.21291.
- [229] Metais, J. Y., C. Navarro, M. J. Santoni, S. Audebert, and J. P. Borg. 2005. "hScrib interacts with ZO-2 at the cell-cell junctions of epithelial cells." *FEBS Lett* 579 (17):3725-30. doi: 10.1016/j.febslet.2005.05.062.
- [230] Meşe, G., G. Richard, and T.W. White. 2007. "Gap Junctions: Basic Structure and Function." *Journal of Investigative Dermatology* 127 (11):2516-2524. doi: 10.1038/sj.jid.5700770.
- [231] Mikaelian, I., M. Malek, R. Gadet, J. Viallet, A. Garcia, A. Girard-Gagnepain, C. Hesling, G. Gillet, P. Gonzalo, R. Rimokh, and M. Billaud. 2013. "Genetic and pharmacologic inhibition of mTORC1 promotes EMT by a TGF-beta-independent mechanism." *Cancer Res* 73 (22):6621-31. doi: 10.1158/0008-5472.can-13-0560.
- [232] Miller, K. D., R. L. Siegel, C. C. Lin, A. B. Mariotto, J. L. Kramer, J. H. Rowland, K. D. Stein, R. Alteri, and A. Jemal. 2016. "Cancer treatment and survivorship statistics, 2016." *CA Cancer J.Clin.* 66 (4):271-289.
- [233] Mitselou, A., V. Galani, U. Skoufi, D. L. Arvanitis, E. Lampri, and E. Ioachim. 2016. "Syndecan-1, Epithelial-Mesenchymal Transition Markers (E-cadherin/beta-catenin) and Neovascularization-related Proteins (PCAM-1 and Endoglin) in Colorectal Cancer." *Anticancer Res* 36 (5):2271-80.
- [234] Mittar, Dev., Rosanto. Paramban, and Catherine. McIntyre. 2011. "Flow Cytometry and High-Content Imaging to Identify Markers of Monocyte-Macrophage Differentiation." Application Note-BD Biosciences. https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_Multicolor_MonocyteMacrophageDiff_AppNote.pdf.
- [235] Molina, J. R., A. A. Adjei, and J. R. Jett. 2006. "Advances in chemotherapy of non-small cell lung cancer." *Chest* 130 (4):1211-1219.
- [236] Mombelli, Sarah. 2014. "Cancers du sein et immunité anti-tumorale."thesis, Reims.
- [237] Moser, B., and K. Willimann. 2004. "Chemokines: role in inflammation and immune surveillance." *Ann Rheum Dis* 63 Suppl 2:ii84-ii89. doi: 10.1136/ard.2004.028316.
- [238] Muller, A., B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M. E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S. N. Wagner, J. L. Barrera, A. Mohar, E. Verastegui, and A. Zlotnik. 2001. "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." *Nature* 410 (6824):50-6. doi: 10.1038/35065016.
- [239] Muller, W. A. 2001. "New Mechanisms and Pathways for Monocyte Recruitment." In *J Exp Med*, f47-52.
- [240] Nair, S., and M. V. Dhodapkar. 2017. "Natural Killer T Cells in Cancer Immunotherapy." *Front Immunol* 8. doi: 10.3389/fimmu.2017.01178.
- [241] Nakagawa, S., and J. M. Huibregtse. 2000. "Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase." *Mol Cell Biol* 20 (21):8244-53.
- [242] Nakaya, Y., and G. Sheng. 2008. "Epithelial to mesenchymal transition during gastrulation: an embryological view." *Dev.Growth Differ.* 50 (9):755-766.

- [243] Nalluri, S. M., J. W. O'Connor, and E. W. Gomez. 2015. "Cytoskeletal signaling in TGFbeta-induced epithelial-mesenchymal transition." *Cytoskeleton (Hoboken)* 72 (11):557-69. doi: 10.1002/cm.21263.
- [244] Nawrocki-Raby, B., C. Gilles, M. Polette, E. Bruyneel, J. Y. Laronze, N. Bonnet, J. M. Foidart, M. Mareel, and P. Birembaut. 2003. "Upregulation of MMPs by soluble E-cadherin in human lung tumor cells." *Int J Cancer* 105 (6):790-5. doi: 10.1002/ijc.11168.
- [245] NCI. 2005. *Surveillance, Epidemiology, and End Results Program*.
- [246] Ngo, V. N., H. Korner, M. D. Gunn, K. N. Schmidt, D. S. Riminton, M. D. Cooper, J. L. Browning, J. D. Sedgwick, and J. G. Cyster. 1999. "Lymphotoxin alpha/beta and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen." *J Exp Med* 189 (2):403-12.
- [247] Nicolás-Ávila, José Ángel, José M. Adrover, and Andrés Hidalgo. 2017. "Neutrophils in Homeostasis, Immunity, and Cancer." *Immunity* 46 (1):15-28. doi: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.12.012>.
- [248] Nielsen, Morten Schak, Lene Nygaard Axelsen, Paul L. Sorgen, Vandana Verma, Mario Delmar, and Niels-Henrik Holstein-Rathlou. 2012. "Gap Junctions." *Comprehensive Physiology* 2 (3):1981-2035. doi: 10.1002/cphy.c110051.
- [249] Nieto, M. A., R. Y. Huang, R. A. Jackson, and J. P. Thiery. 2016. "EMT: 2016." *Cell* 166 (1):21-45. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.028.
- [250] Nishijima, N., M. Seike, C. Soeno, M. Chiba, A. Miyanaga, R. Noro, T. Sugano, M. Matsumoto, K. Kubota, and A. Gemma. 2016. "miR-200/ZEB axis regulates sensitivity to nintedanib in non-small cell lung cancer cells." *Int J Oncol* 48 (3):937-44. doi: 10.3892/ijo.2016.3331.
- [251] Oelkrug, C., and J. M. Ramage. 2014. "Enhancement of T cell recruitment and infiltration into tumours." *Clin Exp Immunol* 178 (1):1-8. doi: 10.1111/cei.12382.
- [252] Oesterreich, S., D. C. Allredl, S. K. Mohsin, Q. Zhang, H. Wong, A. V. Lee, C. K. Osborne, and P. O'Connell. 2001. "High rates of loss of heterozygosity on chromosome 19p13 in human breast cancer." *Br J Cancer* 84 (4):493-8. doi: 10.1054/bjoc.2000.1606.
- [253] Oghumu, S., S. Varikuti, C. Terrazas, D. Kotov, M. W. Nasser, C. A. Powell, R. K. Ganju, and A. R. Satoskar. 2014. "CXCR3 deficiency enhances tumor progression by promoting macrophage M2 polarization in a murine breast cancer model." *Immunology* 143 (1):109-19. doi: 10.1111/imm.12293.
- [254] Oka, T., and M. Sudol. 2009. "Nuclear localization and pro-apoptotic signaling of YAP2 require intact PDZ-binding motif." *Genes Cells* 14 (5):607-15. doi: 10.1111/j.1365-2443.2009.01292.x.
- [255] Okazaki, T., S. Chikuma, Y. Iwai, S. Fagarasan, and T. Honjo. 2013. "A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application." *Nat Immunol* 14 (12):1212-8. doi: 10.1038/ni.2762.
- [256] Olkhanud, P. B., D. Baatar, M. Bodogai, F. Hakim, R. Gress, R. L. Anderson, J. Deng, M. Xu, S. Briest, and A. Biragyn. 2009. "Breast cancer lung metastasis requires expression of chemokine receptor CCR4 and regulatory T cells." *Cancer Res* 69 (14):5996-6004. doi: 10.1158/0008-5472.can-08-4619.
- [257] OMS. 2018a. Cancer.
- [258] OMS. 2018b. Tabagisme.

- [259] Orban, E., E. Szabo, G. Lotz, P. Kupcsulik, C. Paska, Z. Schaff, and A. Kiss. 2008. "Different expression of occludin and ZO-1 in primary and metastatic liver tumors." *Pathol Oncol Res* 14 (3):299-306. doi: 10.1007/s12253-008-9031-2.
- [260] Osinska, Iwona, Dominika Wolosz, Malgorzata Proboszcz, Malgorzata Polubiec-Kownacka, Dariusz Dziedzic, and Joanna Domagala-Kulawik. 2016. "CD163 and CCR7 markers for macrophage polarisation in patients with lung cancer." doi: 10.1183/13993003.congress-2016.PA515.
- [261] Ostrand-Rosenberg, S., L. A. Horn, and S. T. Haile. 2014. "The Programmed Death-1 Immune Suppressive Pathway: Barrier to Anti-Tumor Immunity1." *J Immunol* 193 (8):3835-41. doi: 10.4049/jimmunol.1401572.
- [262] Osugi, Y., S. Vuckovic, and D. N. Hart. 2002. "Myeloid blood CD11c(+) dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells differ in their ability to stimulate T lymphocytes." *Blood* 100 (8):2858-66. doi: 10.1182/blood.V100.8.2858.
- [263] Paik, P. K., A. Drilon, P. D. Fan, H. Yu, N. Rekhtman, M. S. Ginsberg, L. Borsu, N. Schultz, M. F. Berger, C. M. Rudin, and M. Ladanyi. 2015. "Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring MET mutations causing exon 14 skipping." *Cancer Discov.* 5 (8):842-849.
- [264] Pallet, N., and D. Anglicheau. 2008a. *Transition épithélio-mésenchymateuse : aspects fondamentaux.*
- [265] Pan, W., Y. Yang, H. Zhu, Y. Zhang, R. Zhou, and X. Sun. 2016. "KRAS mutation is a weak, but valid predictor for poor prognosis and treatment outcomes in NSCLC: A meta-analysis of 41 studies." *Oncotarget.* 7 (7):8373-8388.
- [266] Papayannopoulos, V., K. D. Metzler, A. Hakkim, and A. Zychlinsky. 2010. "Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps." In *J Cell Biol*, 677-91.
- [267] Park, J., and J. E. Schwarzbauer. 2014. "Mammary epithelial cell interactions with fibronectin stimulate epithelial-mesenchymal transition." *Oncogene* 33 (13):1649-57. doi: 10.1038/onc.2013.118.
- [268] Paschoud, S., M. Bongiovanni, J. C. Pache, and S. Citi. 2007. "Claudin-1 and claudin-5 expression patterns differentiate lung squamous cell carcinomas from adenocarcinomas." *Mod Pathol* 20 (9):947-54. doi: 10.1038/modpathol.3800835.
- [269] Paulsen, E. E., T. K. Kilvaer, M. Rakaee, E. Richardsen, S. M. Hald, S. Andersen, L. T. Busund, R. M. Bremnes, and T. Donnem. 2017. "CTLA-4 expression in the non-small cell lung cancer patient tumor microenvironment: diverging prognostic impact in primary tumors and lymph node metastases." *Cancer Immunol.Immunother.* 66 (11):1449-1461.
- [270] Payne, A. S., and L. A. Cornelius. 2002. "The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis." *J Invest Dermatol* 118 (6):915-22. doi: 10.1046/j.1523-1747.2002.01725.x.
- [271] Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano. 2007. "Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?" *Nat Rev Cancer* 7 (6):415-28. doi: 10.1038/nrc2131.
- [272] Pepin, P. 2006. *Epidémiologie des cancers en Ile-de-France.*
- [273] Perrot, S. 2016. *Consummé, en excès, l'alcool affaiblit aussi les poumons.*

- [274] Pesch, B., B. Kendzia, P. Gustavsson, K. H. Jockel, G. Johnen, H. Pohlabein, A. Olsson, W. Ahrens, I. M. Gross, I. Bruske, H. E. Wichmann, F. Merletti, L. Richiardi, L. Simonato, C. Fortes, J. Siemiatycki, M. E. Parent, D. Consonni, M. T. Landi, N. Caporaso, D. Zaridze, A. Cassidy, N. Szeszenia-Dabrowska, P. Rudnai, J. Lissowska, I. Stucker, E. Fabianova, R. S. Dumitru, V. Bencko, L. Foretova, V. Janout, C. M. Rudin, P. Brennan, P. Boffetta, K. Straif, and T. Bruning. 2012. "Cigarette smoking and lung cancer--relative risk estimates for the major histological types from a pooled analysis of case-control studies." *Int.J.Cancer* 131 (5):1210-1219.
- [275] Pillai, R. N., and S. S. Ramalingam. 2012. "The biology and clinical features of non-small cell lung cancers with EML4-ALK translocation." *Curr.Oncol.Rep.* 14 (2):105-110.
- [276] Planchard, D., B. Besse, H. J. M. Groen, P. J. Souquet, E. Quoix, C. S. Baik, F. Barlesi, T. M. Kim, J. Mazieres, S. Novello, J. R. Rigas, A. Upalawanna, A. M. D'Amelio, Jr., P. Zhang, B. Mookerjee, and B. E. Johnson. 2016. "Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial." *Lancet Oncol.* 17 (7):984-993.
- [277] Polette, M., C. Gilles, B. Nawrocki-Raby, J. Lohi, W. Hunziker, J. M. Foidart, and P. Birembaut. 2005. "Membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression is regulated by zonula occludens-1 in human breast cancer cells." *Cancer Res* 65 (17):7691-8. doi: 10.1158/0008-5472.can-04-4230.
- [278] Polette, M., M. Mestdagt, S. Bindels, B. Nawrocki-Raby, W. Hunziker, J. M. Foidart, P. Birembaut, and C. Gilles. 2007. "Beta-catenin and ZO-1: shuttle molecules involved in tumor invasion-associated epithelial-mesenchymal transition processes." *Cells Tissues Organs* 185 (1-3):61-5. doi: 10.1159/000101304.
- [279] Poli, A., T. Michel, M. Thérésine, E. Andrès, F. Hentges, and J. Zimmer. 2009. "CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset." *Immunology* 126 (4):458-65. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.03027.x.
- [280] Pollard, J. W. 2004. "Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis." In *Nat Rev Cancer*, 71-8. England.
- [281] Polyak, K., and R. A. Weinberg. 2009. "Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits." *Nat Rev Cancer* 9 (4):265-73. doi: 10.1038/nrc2620.
- [282] Powell, D. R., and A. Huttenlocher. 2016. "Neutrophils in the tumor microenvironment." *Trends Immunol* 37 (1):41-52. doi: 10.1016/j.it.2015.11.008.
- [283] Puztaszeri, M., J. C. Pache, N. Mach, P. M. Socal, and T. McKee. 2011. "[Targeted therapy in lung cancer: molecular testing using cytological specimens]." *Rev.Med.Suisse* 7 (303):1486-1490.
- [284] Raez, L. E., S. Fein, and E. R. Podack. 2005. "Lung cancer immunotherapy." *Clin.Med.Res.* 3 (4):221-228.
- [285] Raggi, F., S. Pelassa, D. Pierobon, F. Penco, M. Gattorno, F. Novelli, A. Eva, L. Varesio, M. Giovarelli, and M. C. Bosco. 2017. "Regulation of Human Macrophage M1-M2 Polarization Balance by Hypoxia and the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1." *Front Immunol* 8:1097. doi: 10.3389/fimmu.2017.01097.
- [286] Redjimi, N., C. Raffin, I. Raimbaud, P. Pignon, J. Matsuzaki, K. Odunsi, D. Valmori, and M. Ayyoub. 2012. "CXCR3+ T regulatory cells selectively accumulate in human ovarian carcinomas to limit type I immunity." *Cancer Res* 72 (17):4351-60. doi: 10.1158/0008-5472.can-12-0579.

- [287] Reichert, M., T. Muller, and W. Hunziker. 2000. "The PDZ domains of zonula occludens-1 induce an epithelial to mesenchymal transition of Madin-Darby canine kidney I cells. Evidence for a role of beta-catenin/Tcf/Lef signaling." *J Biol Chem* 275 (13):9492-500.
- [288] Richards, D. M., J. Hettinger, and M. Feuerer. 2013. "Monocytes and Macrophages in Cancer: Development and Functions." In *Cancer Microenviron*, 179-91.
- [289] Ridley, A. J. 2011. "Life at the leading edge." *Cell* 145 (7):1012-22. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.010.
- [290] Riemann, D., M. Cwikowski, S. Turzer, T. Giese, M. Grallert, W. Schutte, and B. Seliger. 2018. "Blood immune cell biomarkers in lung cancer." *Clin Exp Immunol*. doi: 10.1111/cei.13219.
- [291] Roh, M. H., C. J. Liu, S. Laurinec, and B. Margolis. 2002. "The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of discs lost to tight junctions." *J Biol Chem* 277 (30):27501-9. doi: 10.1074/jbc.M201177200.
- [292] Rosales, C., N. Demaurex, C. A. Lowell, and E. Uribe-Querol. 2016. "Neutrophils: Their Role in Innate and Adaptive Immunity." *J Immunol Res* 2016. doi: 10.1155/2016/1469780.
- [293] Rossi, D., and A. Zlotnik. 2000. "The biology of chemokines and their receptors." *Annu Rev Immunol* 18:217-42. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.217.
- [294] Rot, A. 2005. "Contribution of Duffy antigen to chemokine function." *Cytokine Growth Factor Rev* 16 (6):687-94. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.05.011.
- [295] Saadeh, D., M. Kurban, and O. Abbas. 2016. "Plasmacytoid dendritic cell role in cutaneous malignancies." *J Dermatol Sci* 83 (1):3-9. doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.05.008.
- [296] Sacher, A. G., and L. Gandhi. 2016. "Biomarkers for the Clinical Use of PD-1/PD-L1 Inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer: A Review." *JAMA Oncol*. 2 (9):1217-1222.
- [297] Samson, Michel., Florence. Aubry, and Marc. Parmentier. 1999. "Que sont les chimiokines?" *médecine/sciences* 15 (8-9):966-73.
- [298] Sasaki, T., S. J. Rodig, L. R. Chirieac, and P. A. Janne. 2010. "The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer." *Eur.J.Cancer* 46 (10):1773-1780.
- [299] Savagner, P., and V. Arnoux. 2009. "[Epithelio-mesenchymal transition and cutaneous wound healing]." *Bull.Acad.Natl.Med.* 193 (9):1981-1991.
- [300] Scanlon, C. S., E. A. Van Tubergen, R. C. Inglehart, and N. J. D'Silva. 2013. "Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma." *J Dent Res* 92 (2):114-21. doi: 10.1177/0022034512467352.
- [301] Schmidt, A., D. I. Utepbergenov, S. L. Mueller, M. Beyermann, J. Schneider-Mergener, G. Krause, and I. E. Blasig. 2004. "Occludin binds to the SH3-hinge-GuK unit of zonula occludens protein 1: potential mechanism of tight junction regulation." *Cell Mol Life Sci* 61 (11):1354-65. doi: 10.1007/s00018-004-4010-6.
- [302] Sculier, J. P., T. Berghmans, and A. P. Meert. 2014. "TNM classification and clinicopathological factors: what is helpful for adjuvant chemotherapy decision after lung cancer resection?" *J.Thorac.Oncol.* 9 (3):266-270.
- [303] Senan, S., and F. J. Lagerwaard. 2005. "The role of radiotherapy in non-small-cell lung cancer." *Ann.Oncol.* 16 Suppl 2:ii223-ii228.

- [304] Shen, M., P. Hu, F. Donskov, G. Wang, Q. Liu, and J. Du. 2014. "Tumor-associated neutrophils as a new prognostic factor in cancer: a systematic review and meta-analysis." *PLoS One* 9 (6):e98259. doi: 10.1371/journal.pone.0098259.
- [305] Shintani, Y., M. A. Hollingsworth, M. J. Wheelock, and K. R. Johnson. 2006. "Collagen I promotes metastasis in pancreatic cancer by activating c-Jun NH(2)-terminal kinase 1 and up-regulating N-cadherin expression." *Cancer Res* 66 (24):11745-53. doi: 10.1158/0008-5472.can-06-2322.
- [306] Simon, S., and N. Labarriere. 2018. "PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy?" In *Oncoimmunology*.
- [307] Singer, M., and P. J. Sansonetti. 2004. "IL-8 is a key chemokine regulating neutrophil recruitment in a new mouse model of Shigella-induced colitis." *J Immunol* 173 (6):4197-206.
- [308] Sinha, P., V. K. Clements, S. K. Bunt, S. M. Albelda, and S. Ostrand-Rosenberg. 2007. "Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response." *J Immunol* 179 (2):977-83.
- [309] Siri, Aurélie, Hubert de Boysson, and Guilaine Boursier. 2012. "Actualité sur les lymphocytes T régulateurs CD4+." *médecine/sciences* 28 (6-7):646-651. doi: 10.1051/medsci/2012286019.
- [310] Skrypek, N., S. Goossens, E. De Smedt, N. Vandamme, and G. Berx. 2017. "Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Epigenetic Reprogramming Driving Cellular Plasticity." *Trends Genet* 33 (12):943-959. doi: 10.1016/j.tig.2017.08.004.
- [311] Smalley, K. S., P. Brafford, N. K. Haass, J. M. Brandner, E. Brown, and M. Herlyn. 2005. "Up-regulated expression of zonula occludens protein-1 in human melanoma associates with N-cadherin and contributes to invasion and adhesion." *Am J Pathol* 166 (5):1541-54. doi: 10.1016/s0002-9440(10)62370-x.
- [312] Smith, M. C., K. E. Luker, J. R. Garbow, J. L. Prior, E. Jackson, D. Piwnica-Worms, and G. D. Luker. 2004. "CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer." *Cancer Res* 64 (23):8604-12. doi: 10.1158/0008-5472.can-04-1844.
- [313] Smouse, J. H., E. S. Cibas, P. A. Janne, V. A. Joshi, K. H. Zou, and N. I. Lindeman. 2009. "EGFR mutations are detected comparably in cytologic and surgical pathology specimens of nonsmall cell lung cancer." *Cancer* 117 (1):67-72.
- [314] Soda, M., Y. L. Choi, M. Enomoto, S. Takada, Y. Yamashita, S. Ishikawa, S. Fujiwara, H. Watanabe, K. Kurashina, H. Hatanaka, M. Bando, S. Ohno, Y. Ishikawa, H. Aburatani, T. Niki, Y. Sohara, Y. Sugiyama, and H. Mano. 2007. "Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer." *Nature* 448 (7153):561-566.
- [315] Sourisseau, T., A. Georgiadis, A. Tsapara, R. R. Ali, R. Pestell, K. Matter, and M. S. Balda. 2006. "Regulation of PCNA and cyclin D1 expression and epithelial morphogenesis by the ZO-1-regulated transcription factor ZONAB/DbpA." *Mol Cell Biol* 26 (6):2387-98. doi: 10.1128/mcb.26.6.2387-2398.2006.
- [316] Sparmann, A., and D. Bar-Sagi. 2004. "Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis." *Cancer Cell* 6 (5):447-58. doi: 10.1016/j.ccr.2004.09.028.
- [317] Steinman, R. M., and Z. A. Cohn. 1973. "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." *J Exp Med* 137 (5):1142-62.
- [318] Stevenson, B. R., J. D. Siliciano, M. S. Mooseker, and D. A. Goodenough. 1986. "Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia." *J Cell Biol* 103 (3):755-66.

- [319] Stoletov, K., H. Kato, E. Zardouzian, J. Kelber, J. Yang, S. Shattil, and R. Klemke. 2010. "Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells." *J Cell Sci* 123 (Pt 13):2332-41. doi: 10.1242/jcs.069443.
- [320] Strieter, R. M., P. J. Polverini, S. L. Kunkel, D. A. Arenberg, M. D. Burdick, J. Kasper, J. Dzuiba, J. Van Damme, A. Walz, D. Marriott, and *et al.* 1995. "The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis." *J Biol Chem* 270 (45):27348-57.
- [321] Suarez-Carmona, M., M. Bourcy, J. Lesage, N. Leroi, L. Syne, S. Blacher, P. Hubert, C. Epcicum, J. M. Foidart, P. Delvenne, P. Birembaut, A. Noel, M. Polette, and C. Gilles. 2015. "Soluble factors regulated by epithelial-mesenchymal transition mediate tumour angiogenesis and myeloid cell recruitment." *J Pathol* 236 (4):491-504. doi: 10.1002/path.4546.
- [322] Suarez-Carmona, M., J. Lesage, D. Cataldo, and C. Gilles. 2017. "EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression." In *Mol Oncol*, 805-23.
- [323] Sun, S., J. H. Schiller, and A. F. Gazdar. 2007. "Lung cancer in never smokers--a different disease." *Nat.Rev.Cancer* 7 (10):778-790.
- [324] Tachibana, K., S. Hirota, H. Iizasa, H. Yoshida, K. Kawabata, Y. Kataoka, Y. Kitamura, K. Matsushima, N. Yoshida, S. Nishikawa, T. Kishimoto, and T. Nagasawa. 1998. "The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract." *Nature* 393 (6685):591-4. doi: 10.1038/31261.
- [325] Tapia, R., M. Huerta, S. Islas, A. Avila-Flores, E. Lopez-Bayghen, J. Weiske, O. Huber, and L. Gonzalez-Mariscal. 2009. "Zona occludens-2 inhibits cyclin D1 expression and cell proliferation and exhibits changes in localization along the cell cycle." *Mol Biol Cell* 20 (3):1102-17. doi: 10.1091/mbc.E08-03-027710.1091/mbc.e08-03-0277.
- [326] Tazzyman, S., C. E. Lewis, and C. Murdoch. 2009. "Neutrophils: key mediators of tumour angiogenesis." *Int J Exp Pathol* 90 (3):222-31. doi: 10.1111/j.1365-2613.2009.00641.x.
- [327] te Velthuis, A. J., J. F. Admiraal, and C. P. Bagowski. 2007. "Molecular evolution of the MAGUK family in metazoan genomes." *BMC Evol Biol* 7:129. doi: 10.1186/1471-2148-7-129.
- [328] Terabe, M., and J. A. Berzofsky. 2008. "The role of NKT cells in tumor immunity." *Adv Cancer Res* 101:277-348. doi: 10.1016/s0065-230x(08)00408-9.
- [329] Tesone, A. J., M. R. Rutkowski, E. Brencicova, N. Svoronos, A. Perales-Puchalt, T. L. Stephen, M. J. Allegranza, K. K. Payne, J. M. Nguyen, J. Wickramasinghe, J. Tchou, M. E. Borowsky, G. A. Rabinovich, A. V. Kossenkov, and J. R. Conejo-Garcia. 2016. "Satb1 Overexpression Drives Tumor-Promoting Activities in Cancer-Associated Dendritic Cells." *Cell Rep* 14 (7):1774-1786. doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.056.
- [330] Thiery, J. P. 2002. "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." *Nat.Rev.Cancer* 2 (6):442-454.
- [331] Thiery, J. P., H. Acloque, R. Y. Huang, and M. A. Nieto. 2009. "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease." *Cell* 139 (5):871-90. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007.
- [332] Thiery, J. P., and J. P. Sleeman. 2006. "Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 (2):131-42. doi: 10.1038/nrm1835.
- [333] Thompson, E. D., M. Zahurak, A. Murphy, T. Cornish, N. Cuka, E. Abdelfatah, S. Yang, M. Duncan, N. Ahuja, J. M. Taube, R. A. Anders, and R. J. Kelly. 2017. "Patterns of PD-L1 expression and CD8 T cell infiltration in gastric adenocarcinomas and associated immune stroma." *Gut* 66 (5):794-801. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310839.

- [334] Thompson, R. H., M. D. Gillett, J. C. Cheville, C. M. Lohse, H. Dong, W. S. Webster, K. G. Krejci, J. R. Lobo, S. Sengupta, L. Chen, H. Zincke, M. L. Blute, S. E. Strome, B. C. Leibovich, and E. D. Kwon. 2004. "Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (49):17174-9. doi: 10.1073/pnas.0406351101.
- [335] Tian, X., Z. Liu, B. Niu, J. Zhang, T. K. Tan, S. R. Lee, Y. Zhao, D. C. Harris, and G. Zheng. 2011. "E-cadherin/beta-catenin complex and the epithelial barrier." *J Biomed Biotechnol* 2011:567305. doi: 10.1155/2011/567305.
- [336] Torre, L. A., F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, and A. Jemal. 2015. "Global cancer statistics, 2012." *CA Cancer J.Clin.* 65 (2):87-108.
- [337] Travis, W. D., E. Brambilla, A. G. Nicholson, Y. Yatabe, J. H. M. Austin, M. B. Beasley, L. R. Chirieac, S. Dacic, E. Duhig, D. B. Flieder, K. Geisinger, F. R. Hirsch, Y. Ishikawa, K. M. Kerr, M. Noguchi, G. Pelosi, C. A. Powell, M. S. Tsao, and I. Wistuba. 2015. "The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification." *J.Thorac.Oncol.* 10 (9):1243-1260.
- [338] Traweger, A., R. Fuchs, I. A. Krizbai, T. M. Weiger, H. C. Bauer, and H. Bauer. 2003. "The tight junction protein ZO-2 localizes to the nucleus and interacts with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein scaffold attachment factor-B." *J Biol Chem* 278 (4):2692-700. doi: 10.1074/jbc.M206821200.
- [339] Troiani, T., S. Napolitano, C. M. Della Corte, G. Martini, E. Martinelli, F. Morgillo, and F. Ciardiello. 2016. "Therapeutic value of EGFR inhibition in CRC and NSCLC: 15 years of clinical evidence." *ESMO.Open.* 1 (5):e000088.
- [340] Tsai, J. H., J. L. Donaher, D. A. Murphy, S. Chau, and J. Yang. 2012. "Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis." *Cancer Cell* 22 (6):725-36. doi: 10.1016/j.ccr.2012.09.022.
- [341] Tsukita, S., T. Katsuno, Y. Yamazaki, K. Umeda, and A. Tamura. 2009. "Roles of ZO-1 and ZO-2 in establishment of the belt-like adherens and tight junctions with paracellular permselective barrier function." *Ann N Y Acad Sci* 1165:44-52. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04056.x.
- [342] Ungefroren, H., D. Witte, and H. Lehnert. 2018. "The role of small GTPases of the Rho/Rac family in TGF-beta-induced EMT and cell motility in cancer." *Dev Dyn* 247 (3):451-461. doi: 10.1002/dvdy.24505.
- [343] Unité cancer et environnement. 2016. Cancer du poumon.
- [344] Van de Velde, M., M. Garcia-Caballero, T. Durre, F. Kridelka, and A. Noel. 2018. "Ear Sponge Assay: A Method to Investigate Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Mice." *Methods Mol Biol* 1731:223-233. doi: 10.1007/978-1-4939-7595-2_20.
- [345] Vesely, M. D., M. H. Kershaw, R. D. Schreiber, and M. J. Smyth. 2011. "Natural innate and adaptive immunity to cancer." *Annu Rev Immunol* 29:235-71. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101324.
- [346] Vesely, M. D., and R. D. Schreiber. 2013. "Cancer immunoediting: antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy." *Ann N Y Acad Sci* 1284:1-5. doi: 10.1111/nyas.12105.
- [347] Vesuna, F., P. van Diest, J. H. Chen, and V. Raman. 2008. "Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer." *Biochem Biophys Res Commun* 367 (2):235-41. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.11.151.

UV

- [348] Viey, E., G. Fromont, B. Escudier, Y. Morel, S. Da Rocha, S. Chouaib, and A. Caignard. 2005. "Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma." *J Immunol* 174 (3):1338-47.
- [349] Vivier, E., E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, and S. Ugolini. 2008. "Functions of natural killer cells." *Nat Immunol* 9 (5):503-10. doi: 10.1038/ni1582.
- [350] Wagner, K. J. 2008. "Surgical management of non-small cell lung cancer." *Semin.Oncol.Nurs.* 24 (1):41-48.
- [351] Wagner, P. L., E. Hyjek, M. F. Vazquez, D. Meherally, Y. F. Liu, P. A. Chadwick, T. Rengifo, G. L. Sica, J. L. Port, P. C. Lee, S. Paul, N. K. Altorki, and A. Saqi. 2009. "CXCL12 and CXCR4 in adenocarcinoma of the lung: association with metastasis and survival." *J Thorac Cardiovasc Surg* 137 (3):615-21. doi: 10.1016/j.jtcvs.2008.07.039.
- [352] Wakeam, E., S. A. Acuna, N. B. Leighl, M. E. Giuliani, S. R. G. Finlayson, T. K. Varghese, and G. E. Darling. 2017. "Surgery Versus Chemotherapy and Radiotherapy For Early and Locally Advanced Small Cell Lung Cancer: A Propensity-Matched Analysis of Survival." *Lung Cancer* 109:78-88.
- [353] Watanabe, T., K. Sato, and K. Kaibuchi. 2009. "Cadherin-mediated intercellular adhesion and signaling cascades involving small GTPases." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1 (3):a003020. doi: 10.1101/cshperspect.a003020.
- [354] Wei, S., I. Kryczek, and W. Zou. 2006. "Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking." *Blood* 108 (2):426-31. doi: 10.1182/blood-2006-01-0177.
- [355] Weiss, G. J., L. T. Bemis, E. Nakajima, M. Sugita, D. K. Birks, W. A. Robinson, M. Varella-Garcia, P. A. Bunn, Jr., J. Haney, B. A. Helfrich, H. Kato, F. R. Hirsch, and W. A. Franklin. 2008. "EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines." *Ann.Oncol.* 19 (6):1053-1059.
- [356] Wendel, M., I. E. Galani, E. Suri-Payer, and A. Cerwenka. 2008. "Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-gamma and CXCR3 ligands." *Cancer Res* 68 (20):8437-45. doi: 10.1158/0008-5472.can-08-1440.
- [357] WHO. 2013. *International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O-3.1)*.
- [358] Wittchen, E. S., J. Haskins, and B. R. Stevenson. 1999. "Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3." *J Biol Chem* 274 (49):35179-85.
- [359] Wu, D., G. J. LaRosa, and M. I. Simon. 1993. "G protein-coupled signal transduction pathways for interleukin-8." *Science* 261 (5117):101-3.
- [360] Wu, J., and L. L. Lanier. 2003. "Natural killer cells and cancer." *Adv Cancer Res* 90:127-56.
- [361] Wu, T. C., D. P. Tashkin, B. Djahed, and J. E. Rose. 1988. "Pulmonary hazards of smoking marijuana as compared with tobacco." *N.Engl.J.Med.* 318 (6):347-351.
- [362] Xu, J., P. J. Kausalya, D. C. Phua, S. M. Ali, Z. Hossain, and W. Hunziker. 2008. "Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development." *Mol Cell Biol* 28 (5):1669-78. doi: 10.1128/mcb.00891-07.

WX

- [363]** Yang, L., J. Huang, X. Ren, A. E. Gorska, A. Chytil, M. Aakre, D. P. Carbone, L. M. Matrisian, A. Richmond, P. C. Lin, and H. L. Moses. 2008. "Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis." *Cancer Cell* 13 (1):23-35. doi: 10.1016/j.ccr.2007.12.004.
- [364]** Yang, Li, and Yi Zhang. 2017. "Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application." *Journal of Hematology & Oncology* 10 (1):58. doi: doi:10.1186/s13045-017-0430-2.
- [365]** Yokota, J., K. Shiraishi, and T. Kohno. 2010. "Genetic basis for susceptibility to lung cancer: Recent progress and future directions." *Adv.Cancer Res.* 109:51-72.
- [366]** Zaravinos, A. 2015. "The Regulatory Role of MicroRNAs in EMT and Cancer." *J Oncol* 2015:865816. doi: 10.1155/2015/865816.
- [367]** Zarogoulidis, P., F. Katsikogianni, T. Tsiouda, A. Sakkas, N. Katsikogiannis, and K. Zarogoulidis. 2014. "Interleukin-8 and interleukin-17 for cancer." *Cancer Invest* 32 (5):197-205. doi: 10.3109/07357907.2014.898156.
- [368]** Zeisberg, M., and E. G. Neilson. 2009. "Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions." *J.Clin.Invest* 119 (6):1429-1437.
- [369]** Zhang, J., D. Liu, Z. Feng, J. Mao, C. Zhang, Y. Lu, J. Li, Q. Zhang, Q. Li, and L. Li. 2016. "MicroRNA-138 modulates metastasis and EMT in breast cancer cells by targeting vimentin." *Biomed Pharmacother* 77:135-41. doi: 10.1016/j.biopha.2015.12.018.
- [370]** Zhao, Z. M., A. B. Reynolds, and E. A. Gaucher. 2011. "The evolutionary history of the catenin gene family during metazoan evolution." *BMC Evol Biol* 11:198. doi: 10.1186/1471-2148-11-198.
- [371]** Zhu, Jinfang, and William E. Paul. 2008. "CD4 T cells: fates, functions, and faults." doi: 10.1182/blood-2008-05-078154.
- [372]** Zlotnik, A., and O. Yoshie. 2012. "The chemokine superfamily revisited." *Immunity* 36 (5):705-16. doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.008.

YZ

ANNEXE

Zonula occludens-1/NF- κ B/CXCL8: a new regulatory axis for tumor angiogenesis

Julien Lesage,* Meggy Suarez-Carmona,[†] Deborah Neyrinck-Leglantier,* Simon Grelet,[‡] Silvia Blacher,[†] Walter Hunziker,[§] Philippe Birembaut,*[¶] Agnes Noël,[†] Béatrice Nawrocki-Raby,* Christine Gilles,^{†,1} and Myriam Polette*^{¶,1,2}

*INSERM, Unité Mixte de Recherche-S 903, Structure Fédérative de Recherche-Certificat d'Aptitude Professionnelle (SFR-CAP)-Santé, University of Reims Champagne-Ardenne, Reims, France; [†]Laboratory of Tumor and Development Biology, Groupe Interdisciplinaire de Genoproteomique Appliquée (GIGA)-Cancer, University of Liège, Liège, Belgium; [‡]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical University of South Carolina, Charleston, South Carolina, USA; [§]Epithelial Cell Biology Laboratory, Institute of Molecular and Cell Biology, Singapore, Singapore; and [¶]Laboratory of Biopathology, Centres Hospitaliers Universitaires, Reims, France

ABSTRACT: Zonula occludens-1 (ZO-1) is a submembrane scaffolding protein that may display proinvasive functions when it relocates from tight junctions into the cyto-nuclear compartment. This article examines the functional involvement of ZO-1 in CXCL8/IL-8 chemokine expression in lung and breast tumor cells. ZO-1 small interfering RNA and cDNA transfection experiments emphasized regulation of CXCL8/IL-8 expression *via* a cyto-nuclear pool of ZO-1. Luciferase reporter assays highlighted a 173-bp region of CXCL8/IL-8 promoter that responded to ZO-1. Moreover, by using mutated promoter constructs, we identified a NF- κ B site as critical in this activation. Furthermore, NF- κ B pathway signaling analysis revealed both I κ B α and p65 phosphorylation in ZO-1 overexpressing cells and subsequent p65 silencing validated its requirement for CXCL8/IL-8 induction. Investigation of the functional implication of this regulatory axis next showed the proangiogenic activity of ZO-1 in both *ex vivo* and *in vivo* angiogenesis assays. Finally, we found that non-small-cell lung carcinoma that presented a cyto-nuclear ZO-1 pattern was significantly more angiogenic than that without detectable cyto-nuclear ZO-1 expression. Taken together, our results demonstrate that ZO-1 regulates CXCL8/IL-8 expression *via* the NF- κ B signaling pathway and its p65 subunit, which subsequently modulates the transcription of IL-8. We also provide evidence of a newly identified regulatory pathway that could promote angiogenesis. Thus, our results support the concept that the ZO-1 shuttle from the cell junction to the cyto-nuclear compartment may affect both the intrinsic invasive properties of tumor cells and the establishment of the protumoral microenvironment.—Lesage, J., Suarez-Carmona, M., Neyrinck-Leglantier, D., Grelet, S., Blacher, S., Hunziker, W., Birembaut, P., Noël, A., Nawrocki-Raby, B., Gilles, C., Polette, M. Zonula occludens-1/NF- κ B/CXCL8: a new regulatory axis for tumor angiogenesis. *FASEB J.* 31, 000–000 (2017). www.fasebj.org

KEY WORDS: EMT · tumor progression · ZO-1 · IL-8

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a biological program that converts epithelial cells into mesenchymal cells (1). EMT has been implicated in various pathological conditions, especially in cancer and metastasis progression (2, 3). At the molecular level, EMT is characterized by cytoskeleton remodeling (that is, vimentin *de novo* expression) and increased expression of extracellular

matrix-degrading enzymes (4–7). EMT is also associated with reorganization of intercellular adhesion complexes and delocalization of specific molecules that constitute these junctions. It has thus been largely observed that β -catenin relocated out of adherent junctions regulates associated EMT genes that favor tumor cell invasion (8–11). In the same manner, accumulating data have reported that loss of tight junctions and relocation of their constituting molecules is involved in tumor progression (12, 13).

Tight junctions, which play an important role in maintaining cell-cell integrity, are constituted of transmembrane proteins that are connected to the actin cytoskeleton *via* submembrane adaptor molecules, including those of the zonula occludens (ZO) family: ZO-1, ZO-2, and ZO-3 (14). The first described member, ZO-1, is a key component of tight junction organization and interacts with

ABBREVIATIONS: EMT, epithelial-mesenchymal transition; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; MMP, matrix metalloproteinase; NSCLC, non-small-cell lung carcinoma; siRNA, small interfering RNA; ZO-1, zonula occludens-1

¹ These authors contributed equally to this work.

² Correspondence: INSERM, Unité Mixte de Recherche-S 903, 45 Rue Cognacq-Jay, 51 100 Reims, France. E-mail: myriam.polette@univ-reims.fr

doi: 10.1096/fj.201600890R

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

the membrane *via* integral tight junction membrane molecules through its conserved structural domains: 3 PDZ (PSD95/DLG/ZO-1) domains, 1 src homology 3 domain, and 1 guanylate kinase homologous domain (15–17). ZO-1 is thus generally considered to be a tumor suppressor. ZO-1 expression has been found to be diminished in various types of cancers, including those of the breast and colon, though an overexpression of ZO-1 has also been described in melanoma and gastric cancer (18, 19). However, despite the influence of ZO-1 expression levels, data are today accumulating to suggest that its subcellular localization greatly impacts its functions. It has thus been shown in different cellular systems that a delocalization in the cytoplasmic/nuclear compartments provides ZO-1 with promigratory/invasive and protumoral roles (6, 20–22).

In recent years, cytokine overexpression has been reported in many cancers, including lung and breast cancers (23–25). In particular, expression of IL-8, a proinflammatory CXC chemokine (CXCL8/IL-8), has been associated with tumor growth, cell migration, invasion, metastasis, and neovascularization of different types of tumors in *in vivo* and *in vitro* models (25–34). Indeed, it has been shown that overexpression of CXCL8/IL-8 by tumor cells provokes an autocrine signal, which leads to activation of the CXCR2 receptor and promotes growth of melanoma and lung carcinoma cells (35). Furthermore, CXCL8/IL-8 is a glutamate (E)-leucine (L)-arginine (R) ligand that displays a ELR motif that has particularly been involved in the proangiogenic properties of CXCL8/IL-8. Thus, in *in vitro* chemotaxis assays and *in vivo* rat corneal model, CXCL8/IL-8 induces recruitment of endothelial cells that participate directly in vascularization (35, 36). *In vivo*, CXCL8 blocking Abs abrogate angiogenesis in an SCID mouse model of human lung tumorigenesis (37, 38). Moreover, CXCL8 proangiogenic properties may also involve its capacity to attract neutrophils to the tumor site, which, in turn, promote angiogenesis *via* VEGF activation by secreting matrix metalloproteinase (MMP)-9 (39, 40). Finally, in the context of breast cancer, CXCL8/IL-8 is highly expressed in lung metastases compared with primary tumor sites (27) and its expression correlates positively with tumor grade (41). Indeed, by using silencing and overexpression approaches, we previously reported the involvement of a ZO-1 cytonuclear pool in the regulation of CXCL8/IL-8 expression in a panel of breast cancer cells (42).

In the present study, we examined the mechanisms of regulation of CXCL8/IL-8 expression by the cyto-nuclear pool of ZO-1 and its biological relevance. We demonstrate that ZO-1 regulates CXCL8/IL-8 expression *via* activation of the NF- κ B signaling pathway, thereby promoting angiogenesis in a tumor context.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Human cell lines were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). All culture media and reagents were from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Human lung (16HBE, A549, BEAS-2B, BZR) and breast (MCF7,

SKBR3) cell lines were cultured in DMEM that was supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin. For EMT induction, A549 were seeded (1×10^5 cells) in 6-well plates and immediately treated with 5 ng/ml recombinant TGF- β (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Plasmids

The Expression vector that encodes wild type ZO-1 (ZO-1) has been previously described (22). Expression vectors for ZO-2 (ZO-2) and ZO-3 (ZO-3) were obtained from OriGene Technologies (Rockville, MD, USA).

The human CXCL8/IL-8 promoter luciferase reporter constructs have been previously described (43, 44) and were kindly provided by M. A. Buendia (Pasteur Institute, Paris, France) and N. Mukaïda (Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kakuma-machi, Japan). The constructs contain either a –177- or –133-bp 5' upstream region of the CXCL8/IL-8 gene that controls luciferase expression in which activator protein 1 (AP-1) and NF- κ B sites have been mutated (indicated with asterisks) or not (*wt*). A κ B-luc construct (pNF- κ B; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) that contains 3 copies of the consensus κ B binding site that controls luciferase expression has also been used.

Transient transfection of small interfering RNA and cDNA

ZO-1 small interfering RNA (siRNA) was transfected on cells that were plated in 6-well plates (1×10^5) using RNAiMax (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer instructions. Cells were washed 24 h after transfection and serum starved (for A549 TGF- β induction model, TGF- β was readded in serum-free medium). Conditioned media and proteins were collected 48 h later for ELISA and Western blot analyses, respectively. siRNA-specific sequences that were selected in the coding sequence of ZO-1 [GenBank Accession No. L14837; National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, MD, USA; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>] were as follows: ZO-1 si1: 5'-GUUAUACGAGCGAUCUCAU-3' and ZO-1 si2: 5'-GGAG-GAAACAGCUAUAUGG-3'. Corresponding scrambled duplexes that do not recognize any sequence in the human genome were used as controls: ZO-1 scr1: 5'-GGCCAA-CUAUUGAACAAAGU-3' and ZO-1 scr2: 5'-GCCCCCCGCU-CAUCUAUU-3'.

Transient transfections of ZO-1 cDNA expression vector were carried out with X-tremeGENE 9 DNA transfection reagent (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) on 1×10^5 BEAS-2B cells and 1.5×10^5 SKBR3 cells plated in 6-well plates according to manufacturer instructions. Cells were harvested 48 h after transfection for quantitative RT-PCR or Western blot analyzes. Conditioned media were collected for ELISA analyzes, *in vivo* sponge assays, or *ex vivo* aortic rings assays.

For double-transient transfection experiments with ZO-1 expression vector and p65 siRNA, cells were sequentially transfected with siRNA (calcium phosphate method), then with ZO-1 expression vector. Sixteen hours after transfection of siRNA, cells were washed twice with PBS, then transiently transfected with the expression vector for 48 h as detailed above. siRNA-specific sequences that were selected in the coding sequence of p65/NFKB (GenBank Accession No. NC_000011.10; NCBI) were as follows: p65 si1: 5'-GGACAUAUGAGACCUU-CAA-3' and p65 si2: 5'-GCCCUAUCUUUACGUC-3'. Corresponding scrambled duplexes that do not recognize any sequence in the human genome were used as controls: p65 scr1: 5'-GGCCAACUAUUGAACAAAGU-3' and p65 scr2: 5'-GCCCCCCGCUCAUCUAUU-3'.

Western blotting

Total proteins were extracted in RIPA buffer that contained protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics) and phosphatase inhibitor cocktail (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Five to 10 μg of protein extracts were separated by electrophoresis on 10% SDS-PAGE gel, then transferred on PVDF membrane (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Immunoblotting was performed with the following Abs: anti-ZO-1 (mouse monoclonal ZO-1-1A12; Thermo Fisher Scientific), anti-ZO-2 (rabbit polyclonal ZO-2 Z54.PL; Thermo Fisher Scientific), anti-ZO-3 (rabbit polyclonal ZO-3 ZMD.261; Thermo Fisher Scientific), anti-I κ B α (rabbit polyclonal I κ B α C-21; Santa Cruz Biotechnology), anti-p65 (goat polyclonal p65 C-20; Santa Cruz Biotechnology), anti-phospho-p65 (rabbit polyclonal phospho-NF- κ B p65 Ser536; Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA), anti-phospho-I κ B α (monoclonal mouse phospho-I κ B α Ser32/36; Cell Signaling Technologies), and anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; monoclonal mouse anti-GAPDH-6C5; Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were then incubated with specific species horseradish peroxidase-conjugated secondary Ab (Dako, Carpinteria, CA, USA). Signals were visualized using the Amersham ECL Prime kit (GE Healthcare, Freiburg, Germany). Densitometry analysis of bands was done with Multi Gauge (V3.0; Fujifilm, Tokyo, Japan). Results were expressed as a phosphoprotein:total protein ratio and as fold induction to the control condition corresponding to the empty expression vector.

Real-time quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated by using the High Pure RNA isolation kit (Roche Diagnostics). Total RNA (1 μg) was reverse-transcribed into cDNA by using the Transcriptor First Stand cDNA Synthesis kit (Roche Diagnostics). Quantitative PCR reactions were performed by using the fast Start Universal Probe Master kit and the UPL-probe system, as recommended by the manufacturer, in a LightCycler 480 Instrument (Roche Diagnostics). Specific primers (Eurogentec, Seraing, Belgium) for *CXCL8/IL-8* amplification were as follows: forward: 5'-AGACAGCAGAGCACACAAGC-3', reverse: 5'-ATGGTTCCTCCGGTGGT-3'. Results were normalized to expression levels of GAPDH amplified with the following primers: forward: 5'-ACCAGGTGGTCTCCTCTGAC-3', reverse: 5'-TGCTGTAGCCAAATTCGTTG-3'. Results were expressed as *CXCL8/IL-8*: *GAPDH* ratios and as fold induction to the control condition corresponding to the empty expression vector.

Detection of CXCL8/IL-8 by ELISA

CXCL8/IL-8 was measured by using Human IL-8 DuoSet kit (R&D Systems) according to manufacturer instructions. Results are expressed as fold induction to the control condition corresponding to the empty expression vector. Each experiment was carried out at least 3 times.

Immunocytochemistry

MCF-7, 16HBE, A549, BEAS-2B, and BZR cells cultured on glass coverslips were fixed with methanol for 10 min at -20°C . Monolayers were next incubated for 1 h with the mAb to ZO-1 (ZO-1-1A12), then with a polyclonal goat anti-mouse Ab for 1 h. Nuclei are stained with DAPI (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Coverslips were then mounted with Aquapolymount (Polysciences, Warrington, PA, USA) or Citifluor (Agar, United Kingdom) antifading solutions and observed under a Zeiss

fluorescence microscope or with a Zeiss confocal laser scanning microscope, respectively.

Dual-luciferase reporter assays

Transient transfections were performed by using X-tremeGENE 9 DNA transfection reagent on 50,000 cells plated in a 24-well plate 30 min before addition of DNA/X-tremeGene9 mixture as previously described (42). For the determination of the *CXCL8/IL-8* promoter induction by ZO-1, each well was supplemented with a mixture that contained 20 μl serum-free DMEM, 0.6 μl X-tremeGENE9, and 0.2 μg of *CXCL8/IL-8* promoter reporter constructs, 0.2 μg ZO-1 expression vector (or the backbone vector control), and 1.6 ng of *Renilla* luciferase reporter phRG-TK (Promega, Madison, WI, USA) used as an internal control. *Firefly* luciferase:*Renilla* luciferase activity ratio of each sample was measured by using the dual-luciferase assay system (Promega).

Immunodepletion of conditioned media

After their collection, 48 h serum-free conditioned media from ZO-1- or empty vector-transfected cells were incubated overnight under rotation at 4°C with anti-mouse *CXCL8/IL-8* Ab (clone 6217; R&D Systems) or anti-mouse IgG1 negative control (X0931; Dako). Then, after 2 h of incubation under rotation at 4°C with magnetic beads (Dynabeads Protein G; Thermo Fisher Scientific), the antigen-antibody complex formed was precipitated and eliminated, and supernatant was collected. The efficiency of immunodepletion was systematically verified by ELISA.

Sponge assays

Sponge assays were performed as previously described (45). In brief, gelfoam sponges (Pfizer, New York, NY, USA) fragments were soaked in conditioned medium. Sponges were inserted s.c. in mice ears and left for 3 wk. Groups of 5 C57BL/6 mice (Charles River, Chatillon-sur-Chalarone, France) were used and experiment was repeated 3 times. After killing mice, ears were collected and preserved in optimal cutting temperature compound. Ten micron-thick sections were realized across the sponge, fixed in acetone, and permeabilized with methanol before immunostaining with an anti-mouse CD31 Ab (clone MEC 13.3; BD, San Diego, CA, USA), then with Alexa Fluor 546-conjugated anti-mouse Ab (Molecular Probes). Nuclei were counterstained and coverslipped with Duolink *In Situ* Mounting Medium with DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Slides were scanned by using the Nanozoomer (Hamamatsu Photonics, Mont-Saint-Guibert, Belgium) at a $\times 20$ magnification. Blood vessel stainings were automatically detected and blood vessel density was calculated as previously described (45). The total of positive surfaces was normalized by the total sample area. All mouse experiments were performed with approval of the ethical committee of the University of Liège (Approval No. 980).

Aortic ring assays

The protocol for aortic ring assays has been previously described (46). In brief, thoracic aorta from Wistar rats was collected and degreased and small sections were cut. Aortic rings were embedded in collagen type I (1.5 mg/ml; Serva, Heidelberg, Germany) and cultured in conditioned medium

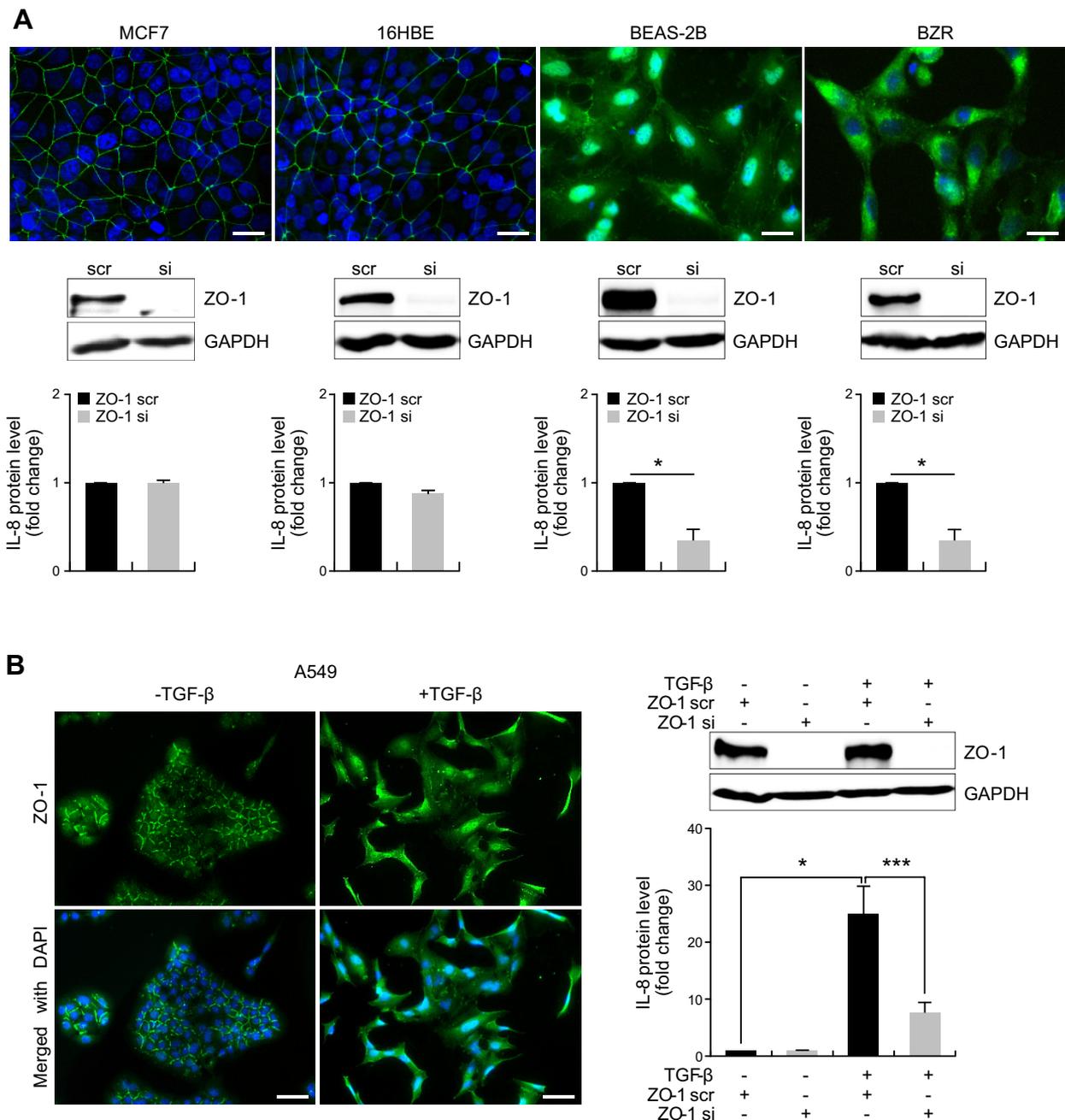


Figure 1. Regulation of CXCL8/IL-8 expression by ZO-1 in human lung and breast cancer cell lines. **A)** Expression of ZO-1 in human cancer cell lines (top). Scale bars, 20 μ m. Efficacy of ZO-1-targeting siRNA (ZO-1 si) or scrambled (ZO-1 scr) in cell lines was verified by Western blot and its effect on CXCL8/IL-8 protein levels was measured in culture supernatant by ELISA (bottom). Data are expressed as fold induction relative to controls; means \pm SEM; $n = 3$; $*P < 0.05$. **B)** Analysis of ZO-1 and CXCL8/IL-8 expression in EMT-induced model of A549 lung adenocarcinoma cells treated with TGF- β (5 ng/ml). Location of ZO-1 was analyzed by immunofluorescence (left). Scale bars, 40 μ m. Impact of ZO-1-targeting siRNA (ZO-1 si) or scrambled (ZO-1 scr) on CXCL8/IL-8 (IL-8) expression in control condition or in EMT condition was measured in culture supernatant by ELISA (right). Data are expressed as fold induction relative to controls; means \pm SEM; $n = 3$. $*P < 0.05$; $***P < 0.001$.

for 9 d. Conditioned medium from ZO-1- or empty vector-transfected cells were prepared with MCDB131 medium (Thermo Fisher Scientific) that was supplemented with 1% penicillin-streptomycin, 1% glutamine, and 1% sodium bicarbonate (92.4 mg/ml). After 9 d of culture, pictures were taken and binary images were analyzed by using semi-automatic detection software, as previously described (47). In brief, the number of intersections between sprouting vessels and a grid formed of concentric rings at fixed intervals from the boundary of the explant were counted. The number of

intersections at each distance from the boundary of the section was plotted.

Immunohistochemical study on human samples

Human lung tissues were obtained from 44 samples of non-small-cell lung carcinomas (NSCLCs) from Reims University Hospital Biological Resource Collection (No. DC-2008-374) and staged according to the 2009 World Health Organization

classification. This study was approved by the institutional review board of Reims University Hospital. Immunohistochemistry for ZO-1 and CD105 was performed on serialied slides as previously described (48) by using a mouse mAb anti-ZO-1 (ZO-1-1A12; Thermo Fisher Scientific) and a rabbit polyclonal anti-CD105 Ab (PA1-37372; Thermo Fisher Scientific). Immunohistochemical detection of cyto-nuclear ZO-1 was scaled as follows: 0, no detection; 1, detection in <10% of tumor cells; 2, detection in 10–25% of tumor cells; 3, detection in 26–50% of tumor cells; and 4, detection in >50% of tumor cells. Immunohistochemical detection of CD105 was scaled as follows: 0, no detection; 1, low detection of labeled cells; 2, middle detection of labeled cells; and 3, high detection of labeled cells. Samples were then grouped as being 0–1 (CD105 low expression) or 2–3 (CD105 high expression).

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SEM ($n = 3$ for *in vitro* experiments). *In vitro* results expressed as fold induction were analyzed with a 2-tailed 1-sample Student's *t* test. *In vivo* results were analyzed with a 2-tailed Mann Whitney test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. Association between ZO-1 and CD105 expression in NSCLC were studied by using χ^2 test. Statistical analyses were performed with Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

RESULTS

CXCL8/IL-8 is specifically up-regulated by ZO-1

To more closely examine the relationship between ZO-1 localization and CXCL8/IL-8 expression, we investigated the impact of ZO-1 siRNA transfection in a set of lung and breast tumor cell lines that have been shown to display either membranous (MCF7 and 16HBE) or cyto-nuclear

localization (BEAS-2B and BZR) of ZO-1 (Fig. 1A). We thus clearly observed that ZO-1 siRNA decreased CXCL8/IL-8 protein expression only in cells that displayed a cyto-nuclear localization of ZO-1 (B2B and BZR; 0.35 ± 0.121 -fold and 0.35 ± 0.118 -fold, respectively; Fig. 1A). In contrast, decreasing ZO-1 expression on cells that displayed a membrane-associated ZO-1 did not alter CXCL8/IL-8 expression (Fig. 1A). Furthermore, we also used A549 cells, which were previously shown to undergo EMT and overexpress CXCL8/IL-8 after TGF- β treatment (22). In this EMT model, TGF- β treatment induced CXCL8/IL-8 at the protein level (25 ± 4.8 -fold) and concomitantly diminished the typical honeycomb membrane staining of ZO-1 (Fig. 1B). Of interest, TGF- β -induced CXCL8/IL-8 by TGF- β was partially abolished when cells were treated with ZO-1 siRNA (6.8 ± 1.73 -fold).

To further explore the relationship between ZO-1 and CXCL8/IL-8 expression, we inversely transiently transfected BEAS-2B tumor cells with expression vectors for ZO-1, -2, or -3. The efficiency of cDNA transfections was confirmed by Western blot analysis (Fig. 2A). Quantitative RT-PCR and ELISA performed on BEAS-2B cell extracts and conditioned media, respectively, revealed that ZO-1 transfection up-regulated CXCL8/IL-8 both at the mRNA (2.76 ± 0.16 -fold) and protein levels (4.21 ± 0.6 -fold; Fig. 2C). On the contrary, CXCL8/IL-8 expression level upon ZO-2 or -3 transfection remain unchanged for both mRNA and protein level. These results obtained on a lung tumor cell line were confirmed on the SKBR3 breast tumor cell line (3.09 ± 0.16 -fold and 4.94 ± 0.6 -fold for mRNA and protein levels, respectively; Fig. 2A, D), which displays a cyto-nuclear localization of ZO-1 as we previously reported (39). We confirmed cyto-nuclear localization of

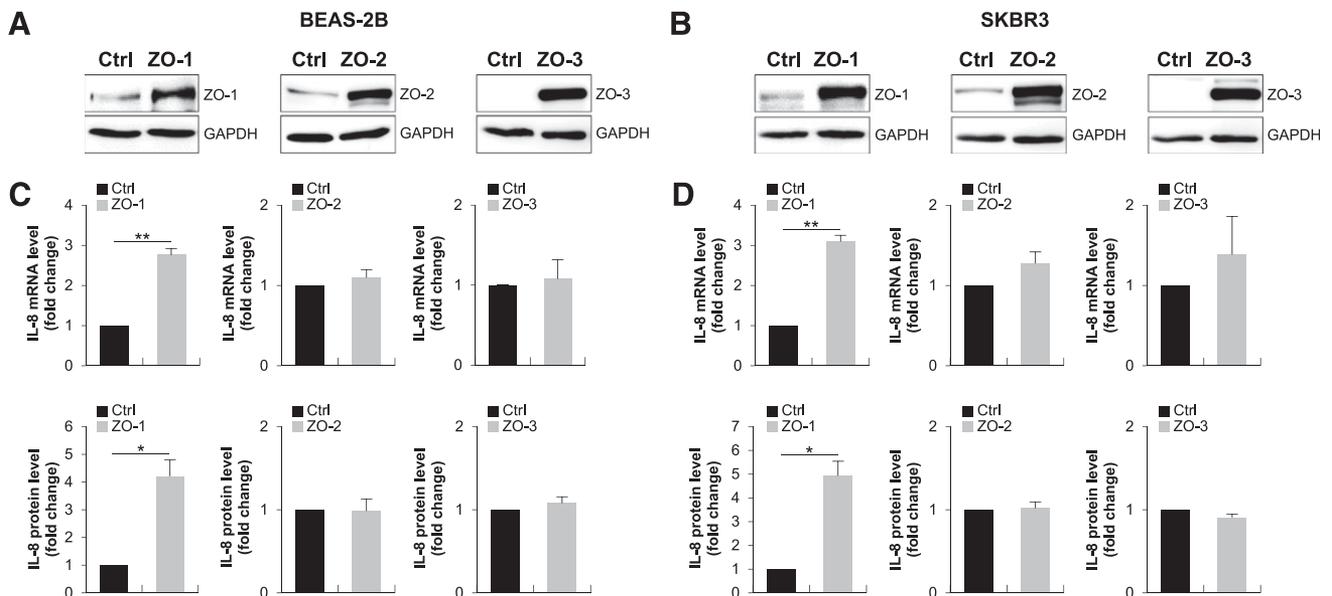


Figure 2. ZO-1 induces CXCL8/IL-8 up-regulation. A, B) Western blot analysis of ZO-1, -2, and -3 levels in protein extracts of BEAS-2B and SKBR3 cell lines transfected with ZO-1, -2 or -3 cDNA or empty vector (ctrl). Levels of GAPDH served as loading control. C, D) Quantitative RT-PCR (top) and ELISA (bottom) analyses of CXCL8/IL-8 (IL-8) mRNA and protein levels, respectively, in BEAS-2B and SKBR3 cell lines transfected with ZO-1, -2 or -3 cDNA or empty vector (ctrl). Bar graphs at top show quantification of CXCL8/IL-8 mRNA levels normalized to GAPDH. All data are expressed as fold induction relative to the respective controls. Means \pm SEM; $n = 3$. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$.

ZO-1 in the BEAS-2B model by immunofluorescence and confocal microscopy (Supplemental Fig. S1). Together, these data suggested that the cyto-nuclear pool of ZO-1 specifically contributes to regulation of CXCL8/IL-8 expression in lung and breast tumor cells.

ZO-1 controls CXCL8/IL-8 promoter activity in a NF-κB-dependent manner

To elucidate potential mechanisms implicated in ZO-1 regulation of CXCL8/IL-8, we performed CXCL8/IL-8 promoter reporter assays. A previously characterized CXCL8/IL-8 promoter fragment of 173 bp was shown to contain binding sites for the nuclear factors PEA3, AP-1, and NF-κB (Fig. 3A) (43, 49). BEAS-2B and SKBR3 cells were cotransfected with the ZO-1 vector expression and different luciferase reporter constructs of the CXCL8/IL-8 promoter presented in Fig. 3B. These constructs contain either the wild-type -173-bp promoter fragment fused to luciferase, the wild-type -133-bp promoter that contains AP-1 and NF-κB

binding sites only and is fused to luciferase, and the -133-bp promoter with mutations of either the AP-1 or NF-κB binding sites and fused to luciferase [-133-(AP-1*)-luc or -133-(NF-κB*)-luc; Fig. 3B]. In accordance with CXCL8/IL-8 mRNA up-regulation (see above), luciferase activity was enhanced in the 2 cell lines after transfection of ZO-1 with all reporter constructs, except the -133-(NF-κB*)-luc construct (Fig. 3C). NF-κB-dependent activation of CXCL8/IL-8 by ZO-1 was confirmed by using the κB-luc construct, which contains multiple NF-κB binding sites upstream of the luciferase reporter gene (Fig. 3D, E). Together, these data support a critical role for the NF-κB pathway in ZO-1-induced CXCL8/IL-8 expression.

ZO-1 controls CXCL8/IL-8 by activating the NF-κB signaling pathway

To further decipher the ZO-1/NF-κB/CXCL8 regulatory axis, expression and phosphorylation of the major players of the NF-κB signaling pathway were analyzed. Western

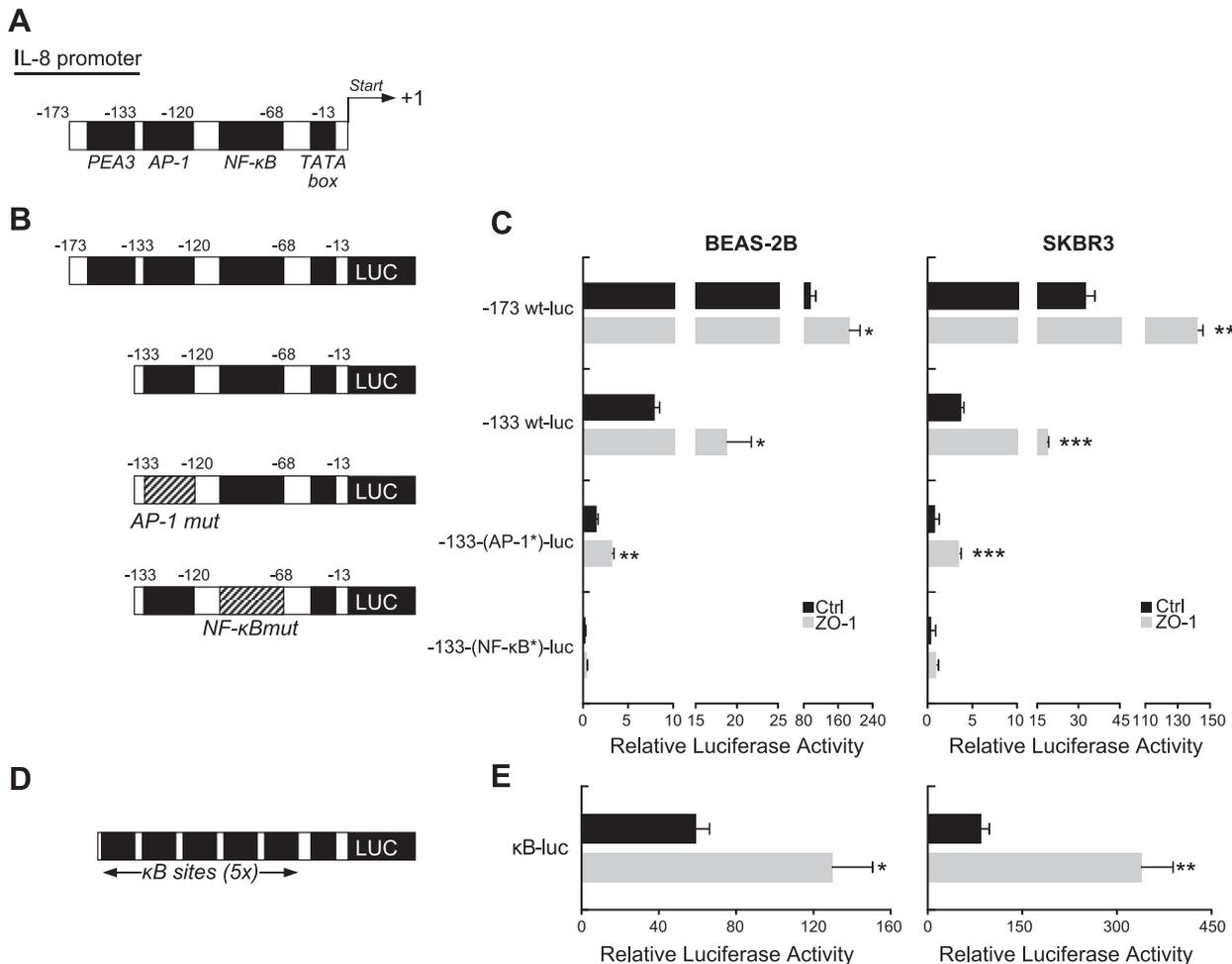


Figure 3. ZO-1 controls the CXCL8/IL-8 promoter in a NF-κB-dependent way. **A**) Schematic representation of the CXCL8/IL-8 (IL-8) promoter annotated with the position of the different transcription factor binding sites. **B, D**) Schematic representation of the different promoter constructs used for luciferase-reporter assay. **C, E**) CXCL8/IL-8 reporter assay. BEAS-2B (left) and SKBR3 (right) cells were transiently cotransfected with ZO-1 cDNA or empty vector (ctrl) and different length of wild-type (wt) or mutated (indicated with an asterisk) CXCL8/IL-8 firefly luciferase reporter vector, followed by a luciferase activity assay. Renilla luciferase served as internal control. Data are expressed as firefly luciferase:Renilla luciferase activity ratio; means \pm SEM; $n = 3$. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

blot analysis revealed that ZO-1 increases the phosphorylation of I κ B α and p65 in both BEAS-2B and SKBR3 cell lines (Fig. 4A). These 2 proteins are phosphorylated on Ser32/36 and Ser536 residues for I κ B α and p65, respectively. This observation correlates with a decreased expression of total I κ B α in ZO-1 condition. These phosphorylation events indicate that ZO-1 activates the canonical NF- κ B signaling pathway. Indeed, in an inactive state, the natural inhibitor I κ B α retains the NF- κ B transcription factor (p50/p65) in the cytoplasm. When the NF- κ B pathway is activated, the IKK complex specifically phosphorylates I κ B α at Ser32/36, which is then degraded by proteasome system. This releases NF- κ B factor free into the cytoplasm. Phosphorylation of p65 at Ser536 results in its nuclear localization and therefore favors its transactivation functions by promoting interactions with coactivator proteins (50).

To further examine the potential implication of p65 in ZO-1-induced CXCL8/IL-8 expression, BEAS-2B and SKBR3 cells were cotransfected with p65 siRNA and ZO-1 cDNA. The efficiency of p65 siRNA transfection was checked by Western blot analysis (Fig. 4B, top), and CXCL8/IL-8 expression was measured by quantitative RT-PCR and ELISA. Our results indicate that p65 silencing is sufficient to abolish ZO-1-dependent up-regulation of CXCL8/IL-8 at both mRNA and protein levels (Fig. 4B, bottom). They also show that ZO-1 acts upstream of p65. Together, these data functionally implicate activation of the NF- κ B

pathway and p65 in ZO-1-induced CXCL8/IL-8 up-regulation.

ZO-1-mediated CXCL8/IL-8 expression promotes angiogenesis

We next assessed the biological consequences of this ZO-1-induced CXCL8/IL-8 expression. In light of the abundant literature data that report the proangiogenic role of CXCL8/IL-8, we focused on examining angiogenesis by using *in vitro* and *in vivo* assays of angiogenesis. Rat aortic ring assays revealed that conditioned medium from ZO-1-transfected cells significantly increases vessel sprouting compared with control conditioned medium (Fig. 5A-C). Depleting CXCL8/IL-8 from ZO-1-transfected BEAS-2B cell conditioned medium (Fig. 5A-C) abolished the proangiogenic activity of ZO-1 on vessel sprouting, which functionally implicated CXCL8/IL-8 in ZO-1-induced angiogenesis. Similar results were obtained in the SKBR3 cell line (Supplemental Fig. S2). To further analyze the consequences of CXCL8/IL-8 induction by ZO-1 *in vivo*, we used the mouse ear sponge assay. We showed that sponges soaked in conditioned medium from ZO-1-transfected cells are infiltrated by a significantly higher number of blood vessels compared with sponges soaked in both control cell conditioned medium and CXCL8/IL-8-depleted

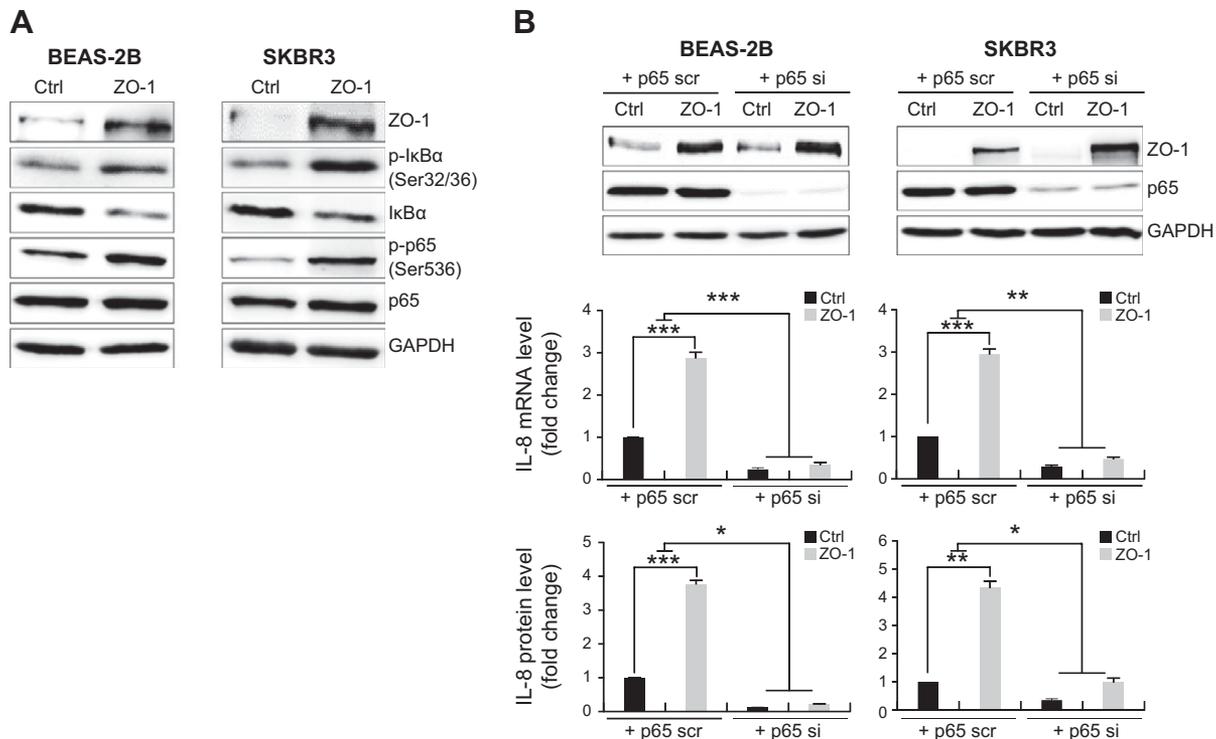


Figure 4. ZO-1 controls the CXCL8/IL-8 expression by triggering the NF- κ B signaling pathway. A) Western blot analysis of I κ B α , p65, and their phosphorylated forms in BEAS-2B (left) and SKBR3 (right) cell lines transfected with ZO-1 expression vector or the corresponding control (Ctrl). Levels of GAPDH served as loading control. B) Western blot analysis of the efficacy of p65-targeting siRNA (p65 si) or scrambled (p65 scr) and its effect on CXCL8/IL-8 (IL-8) mRNA and protein levels measured in quantitative RT-PCR and ELISA, respectively. Bar graphs at top show quantification of CXCL8/IL-8 mRNA levels normalized to GAPDH. All data are expressed as fold induction relative to respective controls. Means \pm SEM; $n = 3$. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

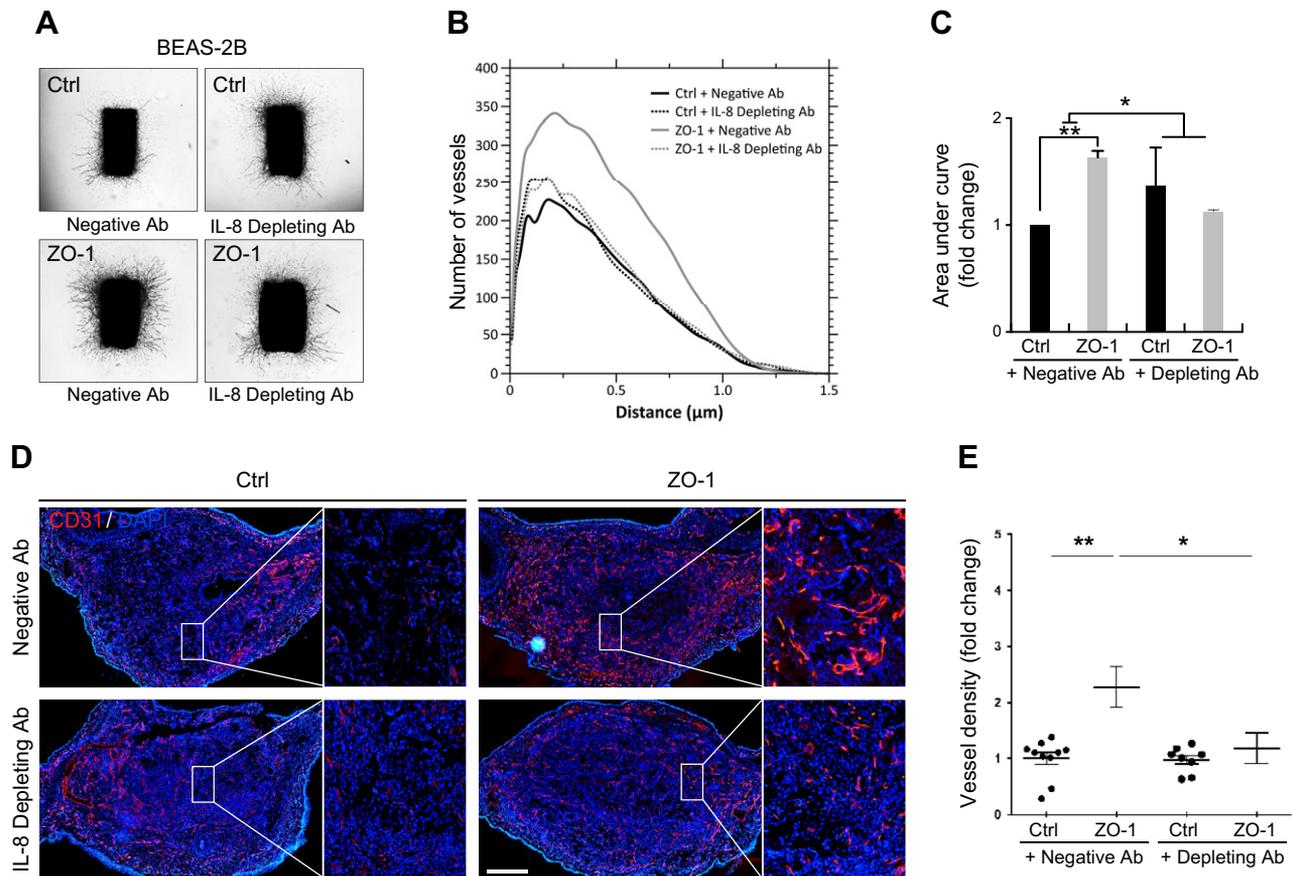


Figure 5. ZO-1-mediated CXCL8/IL-8 expression promotes angiogenesis. *A*) Microscopy images illustrating 9-d aortic rings incubated in conditioned medium of BEAS-2B cell line transfected with ZO-1 expression vector or corresponding control (ctrl), as well as immunodepleted (IL-8 Depleting Ab) or not (Negative Ab) for CXCL8/IL-8 protein. *B*) Computer-assisted quantification of images shown in panel *A*. One representative experiment of 3 is shown. *C*) Area under the curve quantification graphs corresponding to the analyses shown in panel *B*. Data are expressed as fold induction relative to the respective controls; $n = 3$. *D*) Immunofluorescent staining for CD31 (red, labeling blood vessels) on ear sections that contained 3-wk sponges soaked in conditioned medium. DAPI (in blue) is used to label nuclei. Scale bar, 500 μm . *E*) Computer-assisted quantification of CD31 staining, as shown in panel *D* representing blood vessel density. Results were obtained with $n = 8$ mice. All data are expressed with error bars. Means \pm SEM. $*P < 0.05$.

ZO-1-transfected cell conditioned medium (Fig. 5D, E). Similar results were obtained for SKBR3 cells (Supplemental Fig. S2). Together, these results demonstrate that ZO-1-induced CXCL8/IL-8 expression can promote angiogenesis.

ZO-1 nuclear localization relates to increased angiogenesis in human lung cancers

On the basis of the results presented above in *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* animal models, we next evaluated the relationship between angiogenesis and the cyto-nuclear pool of ZO-1 *in vivo* in human NSCLC samples. Thus, we analyzed the expression pattern of ZO-1 and the human vascular endothelium marker CD105 on serial sections of human NSCLC samples.

Of the 44 cases analyzed, 15 displayed at least 10% nuclear ZO-1-positive cancer cells (equaling to a score 2; Table 1). Of interest, samples with the highest proportion of cells harboring cyto-nuclear staining of ZO-1 were associated with an increased density of CD105-positive blood vessels compared with tumors that contained <10% cyto-nuclear ZO-1 cancer cells (Fig. 6 and Table 1).

DISCUSSION

We here provide evidence that the cyto-nuclear pool of ZO-1 regulates CXCL8/IL-8 expression *via* an NF- κ B-dependent pathway and further implicate this newly identified ZO-1/NF- κ B/CXCL8 axis in angiogenesis.

First, we showed that the cyto-nuclear pool of ZO-1 regulates CXCL8/IL-8 expression in lung and breast tumor cell lines. These results confirm our previous observations that showed a correlation between CXCL8/IL-8 expression and the cyto-nuclear localization of ZO-1 in breast cancer cells (42). These data can be related to that of Youmba and colleagues (51) who

TABLE 1. Cyto-nuclear localization of ZO-1 in tumor cells is associated with CD105 expression in NSCLC

Variable	ZO-1 <10 (%) $n = 29$	ZO-1 ≥ 10 (%) $n = 15$	P
CD105 expression			0.0036
Low	20 (87)	3 (13)	
High	9 (43)	12 (57)	

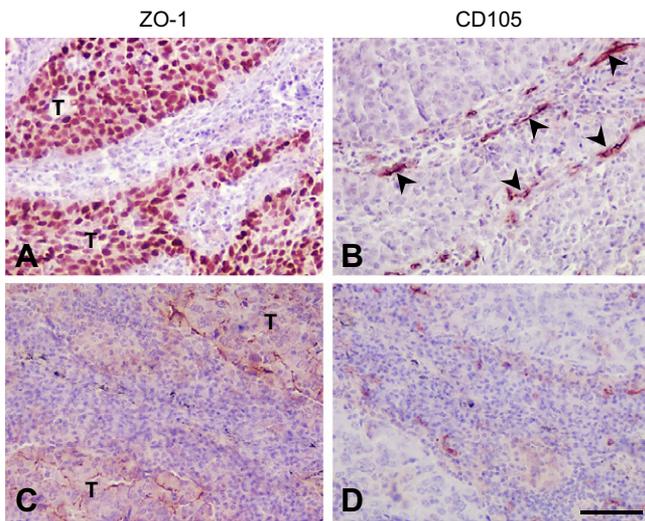


Figure 6. Cyto-nuclear localization of ZO-1 in tumor cells is associated with neoangiogenesis in human lung cancers. Illustrative images of ZO-1 and CD105 staining on serial sections of non-small-cell lung tumor samples showing cyto-nuclear (A) or membranous (C) localization of ZO-1 and the CD105-positive blood vessels (B, D). Arrowheads indicate blood vessels. T, cancer cells. Scale bar, 80 μ m.

reported that methotrexate provokes a subcellular redistribution of ZO-1 and an increase of proinflammatory cytokines, including CXCL8/IL-8, though no functional link was made between ZO-1 relocation and CXCL8/IL-8 overexpression. Furthermore, we showed that CXCL8/IL-8 regulation is specific to ZO-1 as ZO-2 and ZO-3 cDNA transfection did not impact CXCL8/IL-8 expression. Accordingly, despite their common overall structure, the 3 members of the ZO family seem to have specific roles. For instance, ZO-1 enhances the invasive capacity of tumor cells by enhancing MT1-MMP expression (21), whereas ZO-2 displays an anti-invasive role by down-regulating MT1-MMP expression (48). Regarding ZO-3, we previously reported an inverse correlation between ZO-3 expression and an EMT-related invasive phenotype of tumor cells (52).

We further identify NF- κ B as a mediator of CXCL8/IL-8 regulation by ZO-1. Indeed, by using mutated promoter constructs, we established that NF- κ B pathway is involved in ZO-1-triggered CXCL8/IL-8 promoter activation. More particularly, our p65-targeting siRNA experiments indicated that ZO-1 activates NF- κ B signaling by enhancing the phosphorylation of the inhibitory subunit I κ B α (Ser32/36) and p65 (Ser536), which leads to CXCL8/IL-8 up-regulation. Whereas implication of NF- κ B in the regulation of CXCL8/IL-8 is well established, molecular mechanisms that involve ZO-1 in activation of the NF- κ B pathway remains unclear. We can hypothesize that ZO-1 acts upstream of p65 to activate the NF- κ B pathway *via* one or more molecular partners. ZO-1 is indeed a scaffold protein that harbors multiple protein-protein interaction domains, such as 3 PDZ domains, an src homology 3, and a proline-rich domain. In support of this, examples in the literature have reported interactions of such molecular domains with actors of the NF- κ B pathway. For instance, PDZ domains of protein tyrosine

phosphatase-BAS, a membrane-associated protein, have been reported to interact with ankyrin repeats of I κ B α to regulate its activity (53). Nevertheless, whereas our data demonstrate that ZO-1 activates NF- κ B signaling, which leads to CXCL8/IL-8 up-regulation, the precise mechanism remains to be elucidated.

In the present study, we also show that CXCL8/IL-8 secretion induced by cyto-nuclear ZO-1 contributes to the establishment of a proangiogenic environment. Thus, data obtained on human NSCLC tumor samples indicate a correlation between a cyto-nuclear localization of ZO-1 and increased angiogenesis. Corroborating these observations, conditioned medium from ZO-1-transfected cells stimulates vessel sprouting from rat aortic rings *ex vivo* and increases angiogenesis *in vivo* in the sponge assay. These data support the concept that EMT-derived cells, *via* production of soluble factors, create a favorable environment for tumor growth and spreading. In support of this, a recent work showed that EMT-derived lung cells exhibit a secretory profile of factors, including chemokines, that correlates with reduced survival and poor prognosis (54). Likewise, by using an EMT-inducible model, we recently showed that EMT-derived cells secrete a panel of various cytokines, including IL-6, IL-8, and granulocyte macrophage-colony stimulating factor, which promote tumor angiogenesis (25). These results suggest that ZO-1, once delocalized from cell-cell junctions as a consequence of EMT, contribute to the elaboration of a proangiogenic environment by regulating CXCL8/IL-8.

In summary, our results provide new insights into the role of ZO-1 in cancer progression and identify a novel ZO-1/NF- κ B/CXCL8 regulatory axis that creates a microenvironment that facilitates angiogenesis and, thus, tumor growth and invasion. Fj

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Région Champagne-Ardenne, La Ligue Contre le Cancer (Comités de la Marne, Haute-Marne, Meurthe-et-Moselle et Yonne), Lions Club of Soissons, Villers-Cotterets, Château-Thierry and Crépy en Valois, Fond National Pour la Santé ACI 2004-2010 INCa (Cancéropôle Grand-Est Project), Fonds National de la Recherche Scientifique (FRS-FNRS), and Partenariat Hubert Curien-Tourmesol. The authors thank Marie Dehuy, Erika Konradowski, and Isabelle Dasoul (Laboratory of Tumor and Development Biology, University of Liège) for technical assistance. The authors also thank Christine Terryn (Plateforme en Imagerie Cellulaire et Tissulaire, University of Reims Champagne-Ardenne).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J. Lesage, C. Gilles, and M. Polette designed the study; J. Lesage, M. Suarez-Carmona, D. Neyrinck-Leglantier, S. Blacher, B. Nawrocki-Raby, C. Gilles, and M. Polette performed the experiments; J. Lesage, M. Suarez-Carmona, D. Neyrinck-Leglantier, S. Grelet, S. Blacher, W. Hunziker, P. Birembaut, A. Noël, B. Nawrocki-Raby, C. Gilles, and M. Polette analyzed data; and all authors were involved in writing the manuscript and had final approval of the submitted version.

REFERENCES

1. Kalluri, R. (2009) EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J. Clin. Invest.* **119**, 1417–1419
2. Polyak, K., and Weinberg, R. A. (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 265–273
3. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., and Nieto, M. A. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871–890
4. Gilles, C., Polette, M., Piette, J., Delvigne, A. C., Thompson, E. W., Foidart, J. M., and Birembaut, P. (1996) Vimentin expression in cervical carcinomas: association with invasive and migratory potential. *J. Pathol.* **180**, 175–180
5. Nawrocki-Raby, B., Gilles, C., Polette, M., Martinella-Catusse, C., Bonnet, N., Puchelle, E., Foidart, J.-M., Van Roy, F., and Birembaut, P. (2003) E-Cadherin mediates MMP down-regulation in highly invasive bronchial tumor cells. *Am. J. Pathol.* **163**, 653–661
6. Polette, M., Mestdagt, M., Bindels, S., Nawrocki-Raby, B., Hunziker, W., Foidart, J.-M., Birembaut, P., and Gilles, C. (2007) Beta-catenin and ZO-1: shuttle molecules involved in tumor invasion-associated epithelial-mesenchymal transition processes. *Cells Tissues Organs (Print)* **185**, 61–65
7. Pulyaeva, H., Bueno, J., Polette, M., Birembaut, P., Sato, H., Seiki, M., and Thompson, E. W. (1997) MT1-MMP correlates with MMP-2 activation potential seen after epithelial to mesenchymal transition in human breast carcinoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* **15**, 111–120
8. Brabletz, T., Hlubek, F., Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hiendlmeyer, E., Jung, A., and Kirchner, T. (2005) Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs (Print)* **179**, 56–65
9. Gilles, C., Polette, M., Mestdagt, M., Nawrocki-Raby, B., Ruggeri, P., Birembaut, P., and Foidart, J.-M. (2003) Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells. *Cancer Res.* **63**, 2658–2664
10. Sommers, C. L., Heckford, S. E., Skerker, J. M., Worland, P., Torri, J. A., Thompson, E. W., Byers, S. W., and Gelmann, E. P. (1992) Loss of epithelial markers and acquisition of vimentin expression in adriamycin- and vinblastine-resistant human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* **52**, 5190–5197
11. Van Roy, F., and Bex, G. (2008) The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3756–3788
12. González-Mariscal, L., Lechuga, S., and Garay, E. (2007) Role of tight junctions in cell proliferation and cancer. *Prog. Histochem. Cytochem.* **42**, 1–57
13. Martín, T. A., and Jiang, W. G. (2009) Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 872–891
14. Fanning, A. S., Jameson, B. J., Jesaitis, L. A., and Anderson, J. M. (1998) The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **273**, 29745–29753
15. Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S., and Goodenough, D. A. (1986) Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J. Cell Biol.* **103**, 755–766
16. Balda, M. S., and Matter, K. (2008) Tight junctions at a glance. *J. Cell Sci.* **121**, 3677–3682
17. Furuse, M. (2010) Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a002907
18. Smalley, K. S. M., Brafford, P., Haass, N. K., Brandner, J. M., Brown, E., and Herlyn, M. (2005) Up-regulated expression of zonula occludens protein-1 in human melanoma associates with N-cadherin and contributes to invasion and adhesion. *Am. J. Pathol.* **166**, 1541–1554
19. Resnick, M. B., Gavilanez, M., Newton, E., Konkin, T., Bhattacharya, B., Britt, D. E., Sabo, E., and Moss, S. F. (2005) Claudin expression in gastric adenocarcinomas: a tissue microarray study with prognostic correlation. *Hum. Pathol.* **36**, 886–892
20. Gottardi, C. J., Arpin, M., Fanning, A. S., and Louvard, D. (1996) The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10779–10784
21. Polette, M., Gilles, C., Nawrocki-Raby, B., Lohi, J., Hunziker, W., Foidart, J.-M., and Birembaut, P. (2005) Membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression is regulated by zonula occludens-1 in human breast cancer cells. *Cancer Res.* **65**, 7691–7698
22. Reichert, M., Müller, T., and Hunziker, W. (2000) The PDZ domains of zonula occludens-1 induce an epithelial to mesenchymal transition of Madin-Darby canine kidney I cells. Evidence for a role of β -catenin/Tcf/Lef signaling. *J. Biol. Chem.* **275**, 9492–9500
23. Wilson, J., and Balkwill, F. (2002) The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Semin. Cancer Biol.* **12**, 113–120
24. Soria, G., and Ben-Baruch, A. (2008) The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer Lett.* **267**, 271–285
25. Suarez-Carmona, M., Bourcy, M., Lesage, J., Leroy, N., Syne, L., Blacher, S., Hubert, P., Erpicum, C., Foidart, J.-M., Delvenne, P., Birembaut, P., Noël, A., Polette, M., and Gilles, C. (2015) Soluble factors regulated by epithelial-mesenchymal transition mediate tumour angiogenesis and myeloid cell recruitment. *J. Pathol.* **236**, 491–504
26. Waugh, D. J. J., and Wilson, C. (2008) The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* **14**, 6735–6741
27. De Larco, J. E., Wuertz, B. R., Rosner, K. A., Erickson, S. A., Gamache, D. E., Manivel, J. C., and Furcht, L. T. (2001) A potential role for interleukin-8 in the metastatic phenotype of breast carcinoma cells. *Am. J. Pathol.* **158**, 639–646
28. Eck, M., Schmausser, B., Scheller, K., Brändlein, S., and Müller-Hermelink, H. K. (2003) Pleiotropic effects of CXC chemokines in gastric carcinoma: differences in CXCL8 and CXCL1 expression between diffuse and intestinal types of gastric carcinoma. *Clin. Exp. Immunol.* **134**, 508–515
29. Heidemann, J., Ogawa, H., Dwinell, M. B., Rafiee, P., Maaser, C., Gockel, H. R., Otterson, M. F., Ota, D. M., Luger, N., Domschke, W., and Binion, D. G. (2003) Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J. Biol. Chem.* **278**, 8508–8515
30. Singh, S., Singh, A. P., Sharma, B., Owen, L. B., and Singh, R. K. (2010) CXCL8 and its cognate receptors in melanoma progression and metastasis. *Future Oncol.* **6**, 111–116
31. Ning, Y., Manegold, P. C., Hong, Y. K., Zhang, W., Pohl, A., Lurje, G., Winder, T., Yang, D., LaBonte, M. J., Wilson, P. M., Ladner, R. D., and Lenz, H.-J. (2011) Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity *in vitro* and *in vivo* in colon cancer cell line models. *Int. J. Cancer* **128**, 2038–2049
32. Sunaga, N., Imai, H., Shimizu, K., Shames, D. S., Kakegawa, S., Girard, L., Sato, M., Kaira, K., Ishizuka, T., Gazdar, A. F., Minna, J. D., and Mori, M. (2012) Oncogenic KRAS-induced interleukin-8 over-expression promotes cell growth and migration and contributes to aggressive phenotypes of non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer* **130**, 1733–1744
33. Wu, S., Singh, S., Varney, M. L., Kindle, S., and Singh, R. K. (2012) Modulation of CXCL8 expression in human melanoma cells regulates tumor growth, angiogenesis, invasion, and metastasis. *Cancer Med.* **1**, 306–317
34. Wu, S., Shang, H., Cui, L., Zhang, Z., Zhang, Y., Li, Y., Wu, J., Li, R.-K., and Xie, J. (2013) Targeted blockade of interleukin-8 abrogates its promotion of cervical cancer growth and metastasis. *Mol. Cell. Biochem.* **375**, 69–79
35. Vicari, A. P., and Caux, C. (2002) Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **13**, 143–154
36. Strieter, R. M., Polverini, P. J., Kunkel, S. L., Arenberg, D. A., Burdick, M. D., Kasper, J., Dzuiba, J., Van Damme, J., Walz, A., and Marriotti, D., et al. (1995) The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **270**, 27348–27357
37. Arenberg, D. A., Kunkel, S. L., Polverini, P. J., Glass, M., Burdick, M. D., and Strieter, R. M. (1996) Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer in SCID mice. *J. Clin. Invest.* **97**, 2792–2802
38. Smith, D. R., Polverini, P. J., Kunkel, S. L., Orringer, M. B., Whyte, R. I., Burdick, M. D., Wilke, C. A., and Strieter, R. M. (1994) Inhibition of interleukin 8 attenuates angiogenesis in bronchogenic carcinoma. *J. Exp. Med.* **179**, 1409–1415
39. Nozawa, H., Chiu, C., and Hanahan, D. (2006) Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 12493–12498
40. Tazzyman, S., Lewis, C. E., and Murdoch, C. (2009) Neutrophils: key mediators of tumour angiogenesis. *Int. J. Exp. Pathol.* **90**, 222–231
41. Chavey, C., Bibeau, F., Gourgou-Bourgade, S., Burlinon, S., Boissière, F., Laune, D., Roques, S., and Lazennec, G. (2007) Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Res.* **9**, R15
42. Brysse, A., Mestdagt, M., Polette, M., Luczka, E., Hunziker, W., Noël, A., Birembaut, P., Foidart, J.-M., and Gilles, C. (2012) Regulation of

- CXCL8/IL-8 expression by zonula occludens-1 in human breast cancer cells. *Mol. Cancer Res.* **10**, 121–132
43. Lévy, L., Neuveut, C., Renard, C.-A., Charneau, P., Branchereau, S., Gauthier, F., Van Nhieu, J. T., Cherqui, D., Petit-Bertron, A.-F., Mathieu, D., and Buendia, M. A. (2002) Transcriptional activation of interleukin-8 by beta-catenin-Tcf4. *J. Biol. Chem.* **277**, 42386–42393
 44. Okamoto, S., Mukaida, N., Yasumoto, K., Rice, N., Ishikawa, Y., Horiguchi, H., Murakami, S., and Matsushima, K. (1994) The interleukin-8 AP-1 and kappa B-like sites are genetic end targets of FK506-sensitive pathway accompanied by calcium mobilization. *J. Biol. Chem.* **269**, 8582–8589
 45. Lenoir, B., Wagner, D. R., Blacher, S., Sala-Newby, G. B., Newby, A. C., Noël, A., and Devaux, Y. (2014) Effects of adenosine on lymphangiogenesis. *PLoS One* **9**, e92715
 46. Berndt, S., Blacher, S., Perrier d'Hauterive, S., Thiry, M., Tsampalas, M., Cruz, A., Péqueux, C., Lorquet, S., Munaut, C., Noël, A., and Foidart, J.-M. (2009) Chorionic gonadotropin stimulation of angiogenesis and pericyte recruitment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94**, 4567–4574
 47. Detry, B., Blacher, S., Erpicum, C., Paupert, J., Maertens, L., Maillard, C., Munaut, C., Sounni, N. E., Lambert, V., Foidart, J.-M., Rakic, J.-M., Cataldo, D., and Noël, A. (2013) Sunitinib inhibits inflammatory corneal lymphangiogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**, 3082–3093
 48. Luczka, E., Syne, L., Nawrocki-Raby, B., Kileztky, C., Hunziker, W., Birembaut, P., Gilles, C., and Polette, M. (2013) Regulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression by zonula occludens-2 in human lung cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis* **30**, 833–843
 49. Murayama, T., Ohara, Y., Obuchi, M., Khabar, K. S., Higashi, H., Mukaida, N., and Matsushima, K. (1997) Human cytomegalovirus induces interleukin-8 production by a human monocytic cell line, THP-1, through acting concurrently on AP-1- and NF-kappaB-binding sites of the interleukin-8 gene. *J. Virol.* **71**, 5692–5695
 50. Perkins, N. D. (2007) Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 49–62
 51. Beutheu Youmba, S., Belmonte, L., Galas, L., Boukhattala, N., Bôle-Feysot, C., Déchelotte, P., and Coëffier, M. (2012) Methotrexate modulates tight junctions through NF-κB, MEK, and JNK pathways. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **54**, 463–470
 52. Bonnomet, A., Syne, L., Brysse, A., Feyerisen, E., Thompson, E. W., Noël, A., Foidart, J.-M., Birembaut, P., Polette, M., and Gilles, C. (2012) A dynamic *in vivo* model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer. *Oncogene* **31**, 3741–3753
 53. Maekawa, K., Imagawa, N., Naito, A., Harada, S., Yoshie, O., and Takagi, S. (1999) Association of protein-tyrosine phosphatase PTP-BAS with the transcription-factor-inhibitory protein IkappaBalpha through interaction between the PDZ1 domain and ankyrin repeats. *Biochem. J.* **337**, 179–184
 54. Reka, A. K., Chen, G., Jones, R. C., Amunugama, R., Kim, S., Karnovsky, A., Standiford, T. J., Beer, D. G., Omenn, G. S., and Keshamouni, V. G. (2014) Epithelial-mesenchymal transition-associated secretory phenotype predicts survival in lung cancer patients. *Carcinogenesis* **35**, 1292–1300

Received for publication August 18, 2016.
Accepted for publication January 3, 2017.

Zonula occludens-1/NF- κ B/CXCL8: a new regulatory axis for tumor angiogenesis

Julien Lesage, Meggy Suarez-Carmona, Deborah Neyrinck-Leglantier, et al.

FASEB J published online January 5, 2017

Access the most recent version at doi:[10.1096/fj.201600890R](https://doi.org/10.1096/fj.201600890R)

Supplemental Material <http://www.fasebj.org/content/suppl/2017/01/05/fj.201600890R.DC1.html>

Subscriptions Information about subscribing to *The FASEB Journal* is online at <http://www.faseb.org/The-FASEB-Journal/Librarian-s-Resources.aspx>

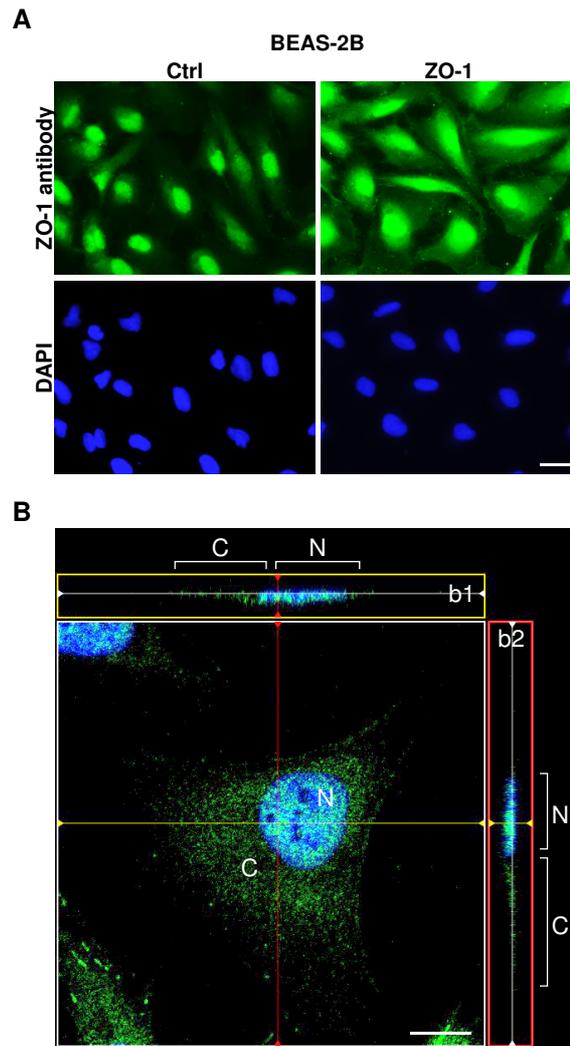
Permissions Submit copyright permission requests at: <http://www.fasebj.org/site/misc/copyright.xhtml>

Email Alerts Receive free email alerts when new an article cites this article - sign up at <http://www.fasebj.org/cgi/alerts>



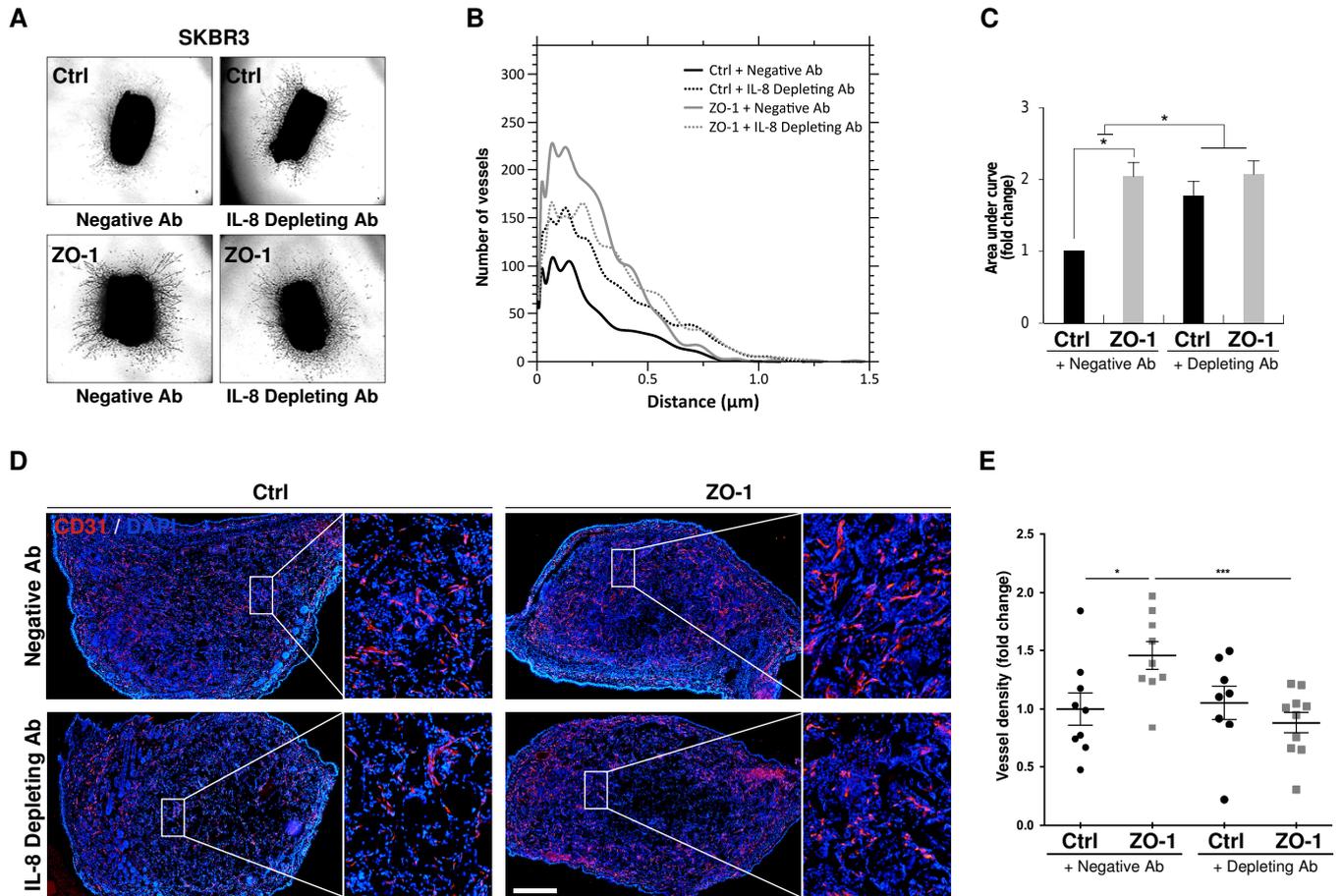
More than Lipids
Solutions for the entire product cycle:
Research to Commercialization





Supplemental Figure S1. Cyto-nuclear localization of ZO-1 in BEAS-2B cells.

(A) Immunofluorescence analysis of ZO-1 in BEAS-2B cells transfected with the ZO-1 expression vector (ZO-1) or the corresponding pLNCX control vector (Ctrl). Scale bar=40μm. (B) Confocal microscopy image of cytoplasmic (C) and nuclear (N) pool of ZO-1 in BEAS-2B cells and orthogonal sectioning in XY axis (b1, b2). Green channel corresponding to ZO-1 staining; Blue channel corresponding to nuclear staining (DAPI). Scale bar=10μm



Supplemental Figure S2. Conditioned medium from ZO-1-transfected cells promotes angiogenesis.

(A) Microscopy images illustrating 9-d aortic rings incubated in conditioned medium of SKBR3 cells transfected with ZO-1 expression vector or the corresponding control (Ctrl); and immunodepleted (IL-8 Depleting Ab) or not (Negative Ab) for CXCL8/IL-8 protein. (B) Computer-assisted quantification of images shown in (A); one representative experiment of three is shown. (C) Area under curve quantification graphs corresponding to the analyses shown in (B); data are expressed as fold induction relative to the respective controls; $n=3$. (D) Immunofluorescent staining for CD31 (red, labelling blood vessels) on ear sections containing 3-week sponges soaked in conditioned medium; DAPI (in blue) is used to label nuclei; scale bar= $500\mu\text{m}$. (E) Computer-assisted quantification of CD31 staining, as shown in (D) representing blood vessel density; $n=8$ mice. All data are expressed with error bars, SEM; * $p < 0.05$.

IMPLICATION DE ZONULA OCCLUDENS-1 DANS LES PROCESSUS PRO-INFLAMMATOIRES ASSOCIÉS À LA PROGRESSION MÉTASTATIQUE DES CANCERS BRONCHO-PULMONAIRES

Zonula occludens 1 (ZO-1) est une protéine sous-membranaire des jonctions serrées impliquée dans l'organisation structurale des cellules épithéliales. Au cours de la progression tumorale, associée au processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), les composants des jonctions intercellulaires sont réorganisés. Notamment, lors de la TEM, la protéine ZO-1 est délocalisée de la membrane vers le cytoplasme et/ou le noyau où elle adopte alors un rôle pro-invasif. Nous avons d'ailleurs montré que ZO-1 cyto-nucléaire régule l'expression de la chimiokine IL-8 dans les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBNPC). Nous nous sommes donc intéressés à l'influence de ZO-1 cyto-nucléaire sur le recrutement des cellules inflammatoires dans les CBNPC. *In vitro*, le niveau d'expression de ZO-1 module le recrutement de la lignée monocyttaire THP-1. Par différentes techniques *in vivo*, nous avons montré que la surexpression de ZO-1 cyto-nucléaire favorise le recrutement de cellules inflammatoires et immunitaires à des temps précoce et tardif de la réponse immunitaire. En parallèle, la caractérisation de l'infiltrat inflammatoire en fonction de la localisation nucléaire de ZO-1 chez les patients atteints de CBNPC a mis en évidence une corrélation entre l'expression cyto-nucléaire de ZO-1 et la présence de lymphocytes T cytotoxiques CD8+ au sein du microenvironnement tumoral.

Ainsi, notre étude révèle un nouveau rôle de la protéine structurale ZO-1. En effet, ZO-1 cyto-nucléaire, associé au processus de TEM, est impliqué dans la mise en place et le développement d'un microenvironnement pro-inflammatoire et/ou pro-immunitaire permissif pour la progression tumorale des CBNPC.

Mots clés : Cancer broncho-pulmonaire (CBP), *Zonula occludens* (ZO)-1, Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM), Microenvironnement tumoral, Cellules inflammatoires

INVOLVEMENT OF ZONULA OCCLUDENS-1 IN PRO-INFLAMMATORY PROCESSES ASSOCIATED TO METASTATIC PROGRESSION OF LUNG CANCERS

Zonula occludens 1 (ZO-1) is a sub-membrane protein of tight junctions involved in the structural organization of epithelial cells. During tumor progression, associated with the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process, intercellular junction components are reorganized. In particular, during EMT, ZO-1 protein is delocalized from the membrane to the cytoplasm and/or the nucleus where it then displays pro-invasive properties. We have shown that ZO-1 cyto-nuclear regulates the expression of chemokine IL-8 in non-small cell lung cancer (NSCLC). We are therefore interested in the influence of cyto-nuclear ZO-1 on the recruitment of inflammatory cells in NSCLC. *In vitro*, the level of expression of ZO-1 modulates the recruitment of the monocyte-like cell line THP-1. By different *in vivo* techniques, we have shown that overexpression of cyto-nuclear ZO-1 promotes the recruitment of inflammatory and immune cells at early and late times of the immune response. In parallel, the characterization of the inflammatory infiltrate as a function of the nuclear localization of ZO-1 in patients with NSCLC revealed a correlation between the cyto-nuclear expression of ZO-1 and the presence of cytotoxic T lymphocytes CD8+ within the tumor microenvironment.

Thus, our study reveals a new role of structural protein ZO-1. Indeed, ZO-1 cyto-nuclear, associated with the EMT process, is involved in the establishment and development of a pro-inflammatory and/or pro-immune microenvironment permissive for tumor progression of NSCLC.

Keywords: Lung cancer, *Zonula occludens* (ZO)-1, Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), Tumor microenvironment, Inflammatory cells

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Université de Reims Champagne-Ardenne –

Unité Inserm UMR-S 1250
Pathologies Pulmonaires et Plasticité Cellulaire (P3Cell)

45 rue Cognacq-Jay, CHU Maison-Blanche,
51092 Reims Cedex