



HAL
open science

Effets anticancereux des glucosides cardiotoniques par induction d'une mort cellulaire immunogène

Laurie Colombe Aude Menger

► **To cite this version:**

Laurie Colombe Aude Menger. Effets anticancereux des glucosides cardiotoniques par induction d'une mort cellulaire immunogène. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA11T053 . tel-00757180

HAL Id: tel-00757180

<https://theses.hal.science/tel-00757180>

Submitted on 26 Nov 2012

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

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

UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Champ disciplinaire : Immunologie-Oncologie

Ecole doctorale de rattachement : Cancérologie, Biologie, Médecine, Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Laurie Colombe Aude MENGER

Le 8 octobre 2012

**EFFETS ANTICANCEREUX DES GLUCOSIDES
CARDIOTONIQUES PAR INDUCTION D'UNE MORT
CELLULAIRE IMMUNOGENÈ**

Directeur de thèse : Pr. Guido KROEMER

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

Pr. Eric DEUTSCH
Pr. Eric TARTOUR
Dr. Isabelle CREMER
Dr. Catherine BRENNER
Pr. Pierre GALANAUD

A ma mère,

"Une théorie qui n'est réfutable par aucun événement qui se puisse concevoir est dépourvue de caractère scientifique." K.Popper

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier profondément le Professeur Guido KROEMER, mon directeur de thèse, pour m'avoir accordé sa confiance, avoir encadré mon travail et permis de mener à bien ce projet. Je tiens à souligner son talent, sa bonne humeur et son dynamisme.

J'exprime également mes sincères remerciements aux membres du jury :

le Professeur Eric DEUTSCH, pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse,
le Docteur Isabelle CREMER et le Professeur Eric TARTOUR pour avoir accepté d'examiner ce travail et apporté leurs précieux conseils,
les Professeurs Catherine BRENNER et Pierre GALANAUD, qui me font le plaisir de prendre part à l'évaluation de ce travail.

Je souhaiterais également témoigner ma sincère reconnaissance au Docteur Isabelle MARTINS pour ses conseils, sa disponibilité et sa gentillesse.

Je remercie le Docteur Oliver KEPP pour son soutien et ses conseils.

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à tous les membres de l'U848 pour leur soutien, leur partage des connaissances scientifiques et leur sympathie. Je tiens aussi à mentionner le plaisir que j'ai eu à travailler avec eux...et qui sont devenus bien plus que des collègues, je pense notamment à Sylvie, Didou, Erika, Sandy, Rocco, Laurent, Marie, Lorenzo, Abdul, Lynda, Yuting, João Paulo, Elodie, Federico.

Je remercie sincèrement les membres des unités U1015 et CRI866 qui ont contribué à ce projet.

J'adresse ma profonde gratitude à tout mon entourage, qui me permet d'avancer tous les jours :

A mes amis, qui ont su être à mes côtés et m'encourager : Maud et Frédéric, Isabelle, Guillaume, Bernard, Elodie, Mélanie, Lauriane, Ty, Sarah, Hayat, Clément, Pierre-Marie, Camille et Mathieu, Antoine, Paul, Tony, Gilles, Anne-Flore, Fanny, Alex, Dima, Valentin, M'Barka, Salim, Chacho.

A toute ma famille... parce que « les mots manquent aux émotions » :

A ma mère Marie-Josée, mon père Dominique, ainsi qu'à mon beau-père Philippe pour leurs encouragements et leur assistance aussi bien matérielle que morale qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans de bonnes conditions,

A mes soeurs adorées Anne-Flore et Virginie,

A Manu, qui est un frère pour moi,

A mon beau-frère Lionel,

A mes neveux Maël et Samolé,

A ma grand-mère Joséphine et tout le reste de la famille

A Aurélien

RESUME

L'efficacité de certains agents anti-cancéreux, notamment les anthracyclines et l'oxaliplatine repose sur l'induction d'une mort cellulaire immunogène (MCI) pouvant conduire à une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique. Les cellules succombant à ce type particulier d'apoptose vont subir certaines modifications définies par un modèle spatio-temporel précis. Celui-ci est caractérisé par la mise en place de signaux d'apparition séquentielle, dont le plus précoce est l'exposition membranaire d'une protéine du réticulum endoplasmique, la calréticuline (CRT) qui constitue un signal de danger essentiel à la phagocytose des cellules mourantes par les cellules dendritiques. Ensuite, à un stade apoptotique, la sécrétion d'adénosine triphosphate (ATP) dépendante de l'autophagie active l'inflammasome NLRP3 et induit la polarisation des cellules T CD8⁺ productrices d'IFN- γ . Enfin, au cours de la nécrose secondaire, le relargage d'un facteur pro-immunogène *High-mobility group protein B1* (HMGB1) est indispensable à une présentation antigénique optimale aux cellules T CD4⁺ et CD8⁺, contribuant ainsi à l'activité tumoricide de la chimiothérapie et protégeant l'hôte d'une éventuelle rechute. De manière à identifier de nouvelles molécules capables d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique, un criblage à haut débit de bibliothèques de composés approuvés par la FDA (*Food and Drug Administration*) a été réalisé grâce à l'utilisation de microscopie automatisée et de biosenseurs permettant la détection de l'exposition de la CRT, de la sécrétion d'ATP et du relargage d'HMGB1. Ce criblage multiparamétrique à haut débit a permis d'identifier les glucosides cardiotoniques (GCs), déjà bien connus pour leur activité cytotoxique préférentielle des cellules cancéreuses, comme étant des inducteurs efficaces de la MCI. Cette découverte a été validée par des méthodes alternatives *in vitro*, suivis d'une étude de la mécanistique d'induction de la MCI par les GCs. Les résultats ont mis en évidence une inhibition spécifique de la sous-unité $\alpha 1$ de la pompe Na⁺ / K⁺ + ATPase, qui à son tour modifie l'homéostasie calcique de la cellule cible, un effet reproduit par les ionophores du Ca²⁺. Nous avons ensuite montré que les CGs, en combinaison avec des chimiothérapies non immunogènes (cisplatine ou mitomycine C) pouvaient vacciner des souris syngéniques contre une ré-injection de cellules cancéreuses vivantes et que les effets antinéoplastiques de ces agents endommageants l'ADN pouvaient être potentialisés par les GCs dans les hôtes immunocompétents mais pas dans les souris immunodéficientes. Enfin, une analyse rétrospective de patients atteints de carcinomes et traités par un GC couramment utilisé en clinique dans la prise en charge de l'insuffisance cardiaque, la digoxine (n=145) a révélé une amélioration significative de la survie globale par rapport à celle de patients non traités (n=290). Les patients ont été appariés en fonction de leur âge, sexe, type de cancer et principaux paramètres pronostiques. Des analyses plus approfondies ont ensuite révélées que la digoxine n'affectait pas la survie globale des patients déjà traités par des agents chimiothérapeutiques immunogènes mais celle des patients ayant reçu des agents autres que les anthracyclines ou l'oxaliplatine.

SUMMARY

The efficacy of some anti-cancer agents, including anthracyclines and oxaliplatin is based on their capacity to induce immunogenic cell death (ICD) in tumor cells. This peculiar type of apoptosis is defined by a sequential emission of specific immunogenic signals from the dying tumor, which in their correct spatio-temporal appearance ignite a specific immune response against therapy resistant and dormant tumor (stem) cells. Thus the early membrane exposure of the ER-resident molecular chaperone calreticulin (CRT) constitutes a critical uptake signal for the engulfment of dying tumor cells by dendritic cells (DCs). Then, at later stages, the autophagy-dependent secretion of ATP and its binding to purinergic receptors on DCs activates the NLRP3 inflammasome. Subsequent release of IL-1 β by DC triggers the polarization of IFN- γ producing CD8⁺ T cells. Finally, during secondary necrosis, the release of the pro-immunogenic high-mobility group box 1 (HMGB1) protein and its interaction with Toll like receptor 4 (TLR4) on DCs facilitates an optimal antigen presentation to T cells. Thus ICD contributes to the tumoricidal activity of chemotherapy and protecting the host from relapse. In order to identify thus far unknown inducers of ICD, a high content screening of compound libraries approved by the Food and Drug Administration (FDA) was conducted by means of robotized automated bioimaging combined with ICD biosensors allowing for the detection of CRT relocation, ATP secretion and HMGB1 release. This multiparametric approach led to the identification of cardiac glycosides (CGs), already well known for their preferential cytotoxic activity on cancer cells, as effective inducers of ICD. The hit compounds were validated by alternative methods *in vitro*, followed by a mechanistic study of GC induced ICD. Results indicated an on-target inhibition of the Na⁺/K⁺ ATPase subunit α 1, which in turn interfered with the Ca²⁺-homeostasis of the target cell, an effect that could be mimicked by Ca²⁺ ionophores. We then showed in different mouse models that tumor cells killed with a combination of GC and non-immunogenic chemotherapy (cisplatin or mitomycin C) have the ability to immunize syngeneic mice against rechallenge with living cells. In addition the antineoplastic effects of these DNA damaging agents *in vivo* were increased by GCs in immunocompetent but not in immunodeficient mice. Finally, retrospective clinical analyses revealed that the administration of the GC digoxin during chemotherapy had a significant positive impact on overall survival in cohorts of breast, colorectal, head and neck, and hepatocellular carcinoma patients, especially when they were treated with agents other than anthracyclines and oxaliplatin.

ABREVIATIONS

ADN:	Acide désoxyribonucléique
ARN:	Acide ribonucléique
ARG1:	Arginase 1
ATP:	Adénosine triphosphate
ATF6:	Activating Transcription Factor 6
Bcl-XL:	B-cell lymphoma-extra large
BM-DCs:	Bone Marrow-Dendritic Cells
CCL-11: “	Chemokine (C-C motif) ligand 11
CD: “	Cluster of Differentiation
CDDP:	Cisplatine
CMH:	Complexe Majeur d’Histocompatibilité
COX-2:	Cyclo-oxygenase 2
CRT:	Calréticuline
CTA:	Cancer Testis Antigen
CTLA-4:	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DAMPs:	Damage Associated Molecular Pattern molecules
DCs:	Dendritic Cells”
DIG:	Digoxine
DIGT:	Digitoxine
DMBA:	Dimethylbentzoanthrasene
FasL:	Ligand de Fas
GCs:	Glucosides Cardiotoniques
GFP:	Green Fluorescent Protein
gld:	generalized disease mutant mice
GM-CSF:	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
Her2:	Human epidermal growth factor receptor 2
HMGB1:	High Mobility Group Box 1
HSP:	Heat Shock Protein
IFN:	Interféron
IL:	Interleukine
IL-1R:	Interleukine 1 Receptor
IL-1RA:	Interleukine 1 Receptor Antagonist
IL-17A:	Interleukine 17A
IRE1:	Inositol-Requiring Enzyme 1
iNOS:	Inductible Nitric Oxide Synthase
Ja18:	Ja18 joining gene segment of TCR
JAK:	Just Another Kinase
Klrk1:	Killer cell lectin-like receptor subfamily K
LB:	Lymphocyte(s) B
LC3:	Light Chain 3”
LMP2:	Low-Molecular-Mass Protein 2
LT:	Lymphocyte(s) T
LT $\gamma\delta$:	Lymphocytes T gamma delta
LXR-L:	Liver X Receptors Ligand
MAGE:	Melanoma-Associated antigen
MCA:	Methylcholanthrene

MDSC:	Myeloid-Derived Suppressor Cells
MGUS:	Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance
MIC:	MHC class I chain-related protein
MitoC:	Mitomycine C
Mlh1:	MutL homolog
MNU:	N-methyl-N-nitrosourea
MTX:	Mitoxantrone
MULT1:	mouse UL16 binding protein-like transcript 1
NK:	Natural Killer
NFκB:	Nuclear Factor-κB
NKG2D:	NK group 2, member D
NLRP3:	NLR family, pyrin domain-containing 3
NY-ESO-1:	New York Esophageal Squamous cell carcinoma 1
PD-L1:	Programmed cell Death 1 Ligand 1
PGE2:	Prostaglandine E2
PSMA:	Prostate Specific Membrane Antigen
RAG2:	Recombinaison Activating Gene 2
RAET-1:	Retinoic Acid Early Transcript 1
RIG:	Retinoid-Inducible Gene
ROS:	Reactive Oxygen Species
SIRPα:	Signal-Regulatory Protein alpha
STAT-1:	Signal Transducer and Activation of Transcription 1
TAM:	Tumor Associates Macrophages
Tc:	Lymphocytes T cytotoxiques
TCR:	T cells Receptor
TGF:	Transforming Growth Factor
Th:	Lymphocyte T CD4 auxiliaire
TIL:	Tumor Infiltrating Lymphocytes
TLR:	Toll Like Receptor
TNF:	Tumor Necosis Factor
TNM:	Tumor Node Metastasis
TPA:	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate
TRAIL:	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAMP:	Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate
Tregs:	Lymphocytes T régulateurs
Trp53:	Transformation related protein 53
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor
WT:	Wild Type

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
RESUME	4
ABREVIATIONS	6
PREAMBULE	9
INTRODUCTION	12
I-Immunité anti-tumorale	13
A-L'immunosurveillance du cancer : naissance d'un concept controversé	13
B-Révision du concept et immunoediting du cancer	15
1. La phase d'élimination	16
1.1 Développement de tumeurs chez des souris immunodéficientes	16
1.2 La phase d'élimination : arguments cliniques, statistiques et histologiques	18
1.3 Immunité innée et adaptative anti-tumorale	21
2. La phase d'équilibre	24
3. La phase d'échappement	25
II- Immunogénicité des cellules tumorales mourantes	32
A- Effets immunostimulants des thérapies anti-cancéreuses conventionnelles	32
B- L'apoptose immunogène ou mort cellulaire immunogène (MCI)	34
C- Les chaperokines, calréticuline, HSP90, HSP70 : des signaux de danger (DAMPs) essentiels à la phagocytose des cellules mourantes	36
D- La sécrétion d'ATP active l'inflammasome NLRP3 et induit la polarisation des cellules T CD8+ productrices d'IFN- γ	39
E- Le relargage d'un facteur pro-immunogène HMGB1, indispensable à une présentation antigénique optimale	43
E- Stratégie d'identification de nouveaux inducteurs de la MCI	48
MATERIEL ET METHODES	50
RESULTATS	56
DISCUSSION	72
REFERENCES	81

PREAMBULE

D'après les données épidémiologiques de l'Institut National du Cancer, l'incidence estimée du cancer est de 365 500 nouveaux cas pour l'année 2011 (207 000 hommes et 158 500 femmes) avec en tête, les cancers prostatiques, pulmonaires et colorectaux chez l'homme et les cancers mammaires, colorectaux et pulmonaires chez la femme. Malgré les progrès récents dans le diagnostic précoce et la prise en charge des cancers, 147 500 personnes (84 500 hommes et 63 000 femmes) en sont décédées cette même année, en France métropolitaine [1]. Il devient donc capital de proposer de nouvelles solutions thérapeutiques adaptées permettant d'en diminuer la mortalité. Actuellement, la stratégie de traitement des pathologies tumorales comprend généralement l'association d'une résection chirurgicale, d'une irradiation locale et l'administration de chimiothérapies (molécules cytostatiques qui bloquent la croissance des cellules en phase de multiplication rapide). La combinaison de ces traitements permet dans certains cas d'obtenir une éradication clinique des tumeurs, mais l'existence de cellules souches cancéreuses conduit fréquemment à une récurrence tumorale locale ou à distance et ainsi, à l'échec thérapeutique. Ces populations cellulaires initiant les tumeurs, relativement rares et biologiquement distinctes ont été identifiées dans les cancers du système hématopoïétique, du cerveau, de la prostate, du sein et dans les mélanomes [2]. Les cellules souches cancéreuses présentent une capacité d'autorenouvellement, un potentiel de développement en chacun des types de cellule de la population tumorale globale et également une capacité de prolifération permettant de conduire l'expansion de la population maligne [3]. Une autre particularité des cellules souches cancéreuses est l'expression de protéines associées à l'efflux de toxines xénobiotiques (i.e les protéines *Multidrug-Resistant* et les membres de la famille des transporteurs *ATP-Binding cassette*) qui confèrent une résistance à de nombreux agents chimiothérapeutiques. De tels échappements aux traitements classiques entraînent l'utilisation de thérapies ciblées, comme l'iode radioactif, les anticorps monoclonaux, les antagonistes des récepteurs hormonaux ou les inhibiteurs de tyrosine kinase. Cependant, malgré des efforts concertés de la part des scientifiques et des cliniciens et en dépit de progrès considérables dans la biologie des cellules cancéreuses, le cancer reste une des premières causes de mortalité dans les pays industrialisés. Afin de garantir une guérison complète, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques mieux tolérées, outrepassant la résistance aux drogues et garantissant une

surveillance par éradication d'éventuelles cellules tumorales résiduelles devient une nécessité primordiale.

Pendant longtemps, le bénéfice thérapeutique des traitements anticancéreux n'a été attribué qu'à leur capacité à détruire les cellules cancéreuses, ou à leur faculté d'induction d'un arrêt permanent du cycle cellulaire (senescence). Dans les deux cas, l'efficacité des thérapies a été perçue comme dépendante des seules caractéristiques intrinsèques des cellules cancéreuses.

Les mécanismes fondamentaux de division cellulaire et de réplication de l'ADN, du fait de la machinerie de réplication, sont à l'origine d'erreurs pouvant compromettre l'intégrité du génome et potentiellement induire la formation d'un cancer. Les recherches de ces cinquante dernières années ont révélé que le cancer était une maladie génétique, provenant d'un processus d'évolution de cellules somatiques ayant outrepassées les barrières et les contrôles d'expansion. Il a été établi que six événements intrinsèques déterminent l'oncogénèse précoce: le maintien d'une signalisation de prolifération, l'échappement aux signaux répresseurs de croissance, l'activation d'une invasion tissulaire, un processus réplicatif immortalisant, l'induction d'une néo-angiogénèse et enfin une résistance à la mort cellulaire [4]. Toutefois, de nombreux mécanismes suppresseurs de tumeur intrinsèques et extrinsèques existent pour empêcher leur développement. Récemment, l'importance des voies extrinsèques et notamment du microenvironnement tumoral (incluant les cellules stromales et le système immunitaire) a été mis en avant. Ainsi l'échappement à l'immunosurveillance est venue s'ajouter à ces caractéristiques communes aux cellules tumorales leur permettant de se développer et de former une tumeur [5]. Le développement de thérapies modulant des voies extrinsèques aux cellules tumorales est une alternative intéressante et il est désormais établi que le bénéfice d'une chimiothérapie peut être influencée à de multiples niveaux par le système immunitaire de l'hôte. La chimiothérapie peut éliminer les cellules cancéreuses en les amenant à provoquer une réponse immunitaire ou encore, en augmentant leur sensibilité à l'attaque immunitaire. En outre, la chimiothérapie peut stimuler de façon directe des effecteurs anticancéreux du système immunitaire ou subvertir des mécanismes immunosuppresseurs. En conséquence, l'état fonctionnel du système immunitaire de l'hôte a un impact pronostique et prédictif majeur sur le devenir des patients atteints de cancer, traités par chimiothérapie conventionnelle ou ciblée [6].

L'efficacité de certaines chimiothérapies conventionnelles, notamment les anthracyclines et l'oxaliplatine tient à leur capacité d'induire un type de stress et de mort

cellulaire immunogène (MCI) qui convertit les cellules mourantes des patients en vaccin pouvant stimuler des réponses immunitaires anti-tumorales. Grâce à une plate-forme de microscopie à fluorescence permettant la détection automatique des caractéristiques biochimiques de cette mort cellulaire particulière, nous avons identifié les glucosides cardiotoniques (GCs) comme étant des inducteurs de la MCI d'une efficacité exceptionnelle. Cette découverte par criblage à haut débit de composés approuvés par la FDA, (*Food and Drug Administration*) a été validée par des méthodes alternatives *in vitro*, suivis d'une étude de la mécanistique d'induction de la MCI par les GCs. Ensuite, nous avons montré que les GCs, en combinaison avec des chimiothérapies non immunogènes (cisplatine ou mitomycine C) pouvaient vacciner des souris syngéniques contre une ré-injection de cellules cancéreuses vivantes et que les effets antinéoplastiques de ces agents endommageants l'ADN pouvaient être potentialisés par les GCs dans les hôtes immunocompétents mais pas dans les souris immunodéficientes. Enfin, cette étude a été complétée par une analyse rétrospective de la survie globale de patients atteints de carcinomes et traités par un GC couramment utilisé en clinique dans la prise en charge de l'insuffisance cardiaque ou des troubles du rythme supraventriculaire, la digoxine.

En raison de l'utilisation d'un procédé de criblage (et non d'une théorisation) et par souci de logique argumentative, les GCs ne seront développés qu'à partir des résultats et dans la discussion de ce manuscrit. Vous seront donc présentés ci-dessous, l'historique et la mécanistique de l'immunité anti-tumorale mais aussi les caractéristiques de l'immunogénicité des cellules mourantes avec une attention particulière pour les trois paramètres biochimiques essentiels à la MCI, à savoir l'exposition de la calréticuline à la surface membranaire, la sécrétion d'ATP et le relargage d'HMGB1. L'élucidation des modalités de la MCI est le résultat d'un parcours long et difficile mais qui a permis, grâce aux avancées technologiques d'identifier de nouvelles thérapies potentielles pour le traitement prolongé du cancer.

INTRODUCTION

I-Immunité anti-tumorale

A-L'immunosurveillance du cancer : naissance d'un concept controversé

L'une des questions les plus controversées en matière d'immunologie depuis plus d'un siècle a été de savoir si le système immunitaire pouvait détecter et éliminer des cellules altérées par des événements mutationnels et épigénétiques. La polémique autour de la théorie d'immunosurveillance ainsi que ses bases historiques et expérimentales ont permis de caractériser les mécanismes moléculaires et cellulaires d'un concept plus large, "l'*Immunoediting*" du cancer, qui définit à la fois la complexité et la dualité du rôle du système immunitaire dans la protection contre la formation tumorale et l'échappement à la destruction des variants tumoraux faiblement immunogènes.

L'immunité anti-tumorale est une idée déjà ancienne car elle fut utilisée dès la fin du 19^{ème} siècle. Dans les années 1890, le chirurgien américain William B. Coley, considéré aujourd'hui comme le « père de l'immunothérapie du cancer », a décrit une rémission spontanée chez plusieurs patients atteints de sarcomes, après infection aigue par des toxines bactériennes [7]. Il a alors découvert que d'autres pionniers de la médecine, notamment Louis Pasteur, Robert Koch et Emil Von Behring avaient eux aussi observé une régression du développement tumoral concomitante à l'infection par Erysipelas. WB Coley a donc injecté un mélange de bactéries inactivées, appelés par la suite les « toxines de Coley », à un patient inopérable présentant un stade avancé de la maladie. Cette première tentative d'utilisation du système immunitaire pour lutter contre le cancer aboutit à une régression tumorale complète, le patient survécut 26 années supplémentaires et décéda d'une attaque cardiaque. Mais ce n'est qu'en 1909 que la théorisation d'une protection contre les maladies néoplasiques par le système immunitaire a été proposée par Paul Ehrlich [8]. Il faudra ensuite attendre les années 1950 et les progrès dans le domaine de l'immunologie pour argumenter l'existence d'antigènes tumoraux. Les travaux de Medawar et de ses collègues ont ainsi permis de clarifier le rôle essentiel des composants de l'immunité dans le rejet de l'allogreffe [9]. Ils observèrent une destruction de tumeurs transplantées dans des souris non consanguines mais cette vaccination fut plus attribuée au rejet du non-soi inhérent à allogreffe qu'à l'implication d'un rejet tumoral spécifique. Par la suite, avec la disponibilité de souches de souris consanguines, il a été possible d'évaluer si les tumeurs étaient immunologiquement distinctes des cellules normales. En 1957, Richmond Prehn et Joan Main ont montré que les sarcomes induits par un carcinogène chimique (methylcholanthrene MCA) chez la souris, pouvaient

stimuler une réponse immunitaire anti-tumorale capable d'entraîner un rejet après ré-administration [10]. Cette vaccination contre les transplantations syngéniques démontra l'existence d'antigènes tumoraux spécifiques. Quelques années plus tard, d'autres équipes ont démontré que des souris syngéniques immunisées réagissaient contre les cellules tumorales de même type et non contre les cellules correspondantes non transformées [11]. L'enrichissement du concept par la notion d'immunosurveillance, apportée par MacFarlane Burnet et Lewis Thomas proposa que les lymphocytes agissent comme des sentinelles capables de reconnaître et éliminer de manière continue les cellules transformées naissantes présentant des néo-antigènes spécifiques [12]. L'introduction de ce concept d'immunosurveillance a été alors suivie par diverses expériences dont le but était de tester si l'altération du système immunitaire pouvait augmenter l'incidence des cancers par rapport aux hôtes immunocompétents. Toutefois, un consensus sur l'apparition accrue des tumeurs dans des souris immunodéficientes (thymectomie néonatale, sérum anti-lymphocytes) fut difficile à trouver étant donné la discordance des résultats [13, 14] [15]. Stutman démontra même l'absence de différences significatives entre la formation des tumeurs induites chimiquement chez les souris *Nude* CBA/H (athymiques) et chez les souris de type sauvage. Ainsi, étant donné la faible compréhension des déficiences immunologiques des modèles de souris *Nude* à disposition à cette époque, ces résultats suffirent à convaincre la communauté scientifique et conduisit à l'abandon du concept d'immunosurveillance du cancer. Même les programmes d'identification de molécules anticancéreuses négligèrent la possibilité que les réactions immunitaires puissent contribuer à l'efficacité du traitement puisque depuis 1976, le NCI « *National Cancer Institute* » utilise des modèles murins immunodéficients pour identifier les molécules d'intérêt via la xénotransplantation de tumeurs humaines [16].

Nous savons désormais que les souris *Nude* ne sont pas totalement immuno-déficientes, elles possèdent en l'occurrence un système immunitaire inné et d'autres populations lymphocytaires fonctionnelles : des lymphocytes portant les TCR $\alpha\beta$, des cellules T $\gamma\delta$ et des cellules NK, dont le développement est indépendant du thymus [17, 18]. De plus, il a été démontré que les souris de souche *Nude* CBA/H expriment une enzyme (l'hydroxylase aryl) ayant une activité spécifique pour la conversion du MCA, les rendant plus fortement sensibles à l'induction tumorale [19]. A partir des années 1960, les premières manipulations immunitaires chez l'Homme débutèrent avec les greffes de moelle osseuse, correspondant à des transferts de cellules souches hématopoïétiques et donc du système immunitaire du donneur vers le corps du receveur. En parallèle de ces premiers essais d'immunostimulation, l'intérêt du bacille de Calmette-Guérin (BCG) dans le traitement du cancer de la vessie,

ravivé par Coe et Feldman, donne lieu en 1976 à un essai clinique d'inoculation intravésicale du BCG conduit par A. Morales et al. Cet essai démontra une diminution significative du taux de récurrence du cancer superficiel de la vessie chez neuf patients. L'administration intravésicale de BCG est actuellement efficace pour induire une immunité tumorale chez les patients atteints d'un cancer de la vessie musculaire non invasif avec une réponse clinique de 50 à 70%. De très récents travaux viennent de démontrer qu'une administration répétée de BCG vivant était nécessaire pour obtenir une robuste infiltration tumorale de cellules T et un apprêtement de ces cellules productrices d'interféron γ (IFN- γ) [20].

B-Révision du concept et immunoediting du cancer

Plus récemment, le développement des technologies de manipulation génétique comme la production de souris transgéniques ou d'anticorps monoclonaux spécifiques de certains composants du système immunitaire ont permis de tester de manière non équivoque et de caractériser moléculairement la théorie d'immunosurveillance.

Ainsi, au début des années 1990, Pierre van der Bruggen et ses collègues ont identifié pour la première fois un gène codant pour l'expression d'un antigène de mélanome humain MZ2-E, non retrouvé dans les tissus normaux. Quelques années plus tard, en 1994, l'équipe du Dr R. Schreiber, en utilisant des approches de transplantations tumorales, a montré que des fibrosarcomes immunogènes avaient une croissance plus rapide et plus efficace dans des souris traitées par des anticorps neutralisants, spécifiques de l'IFN- γ [21]. En outre, des expériences sur les souris 129/SvEv, déficientes pour le récepteur de l'IFN- γ et la signalisation dépendante de STAT1 ont révélé qu'elles étaient 10 à 20 fois plus sensibles à l'induction tumorale par le MCA (methylcholanthrène) que les souris WT [22]. Ainsi, la production endogène d'IFN- γ constitue la base de la surveillance tumorale par le système immunitaire, en contrôlant à la fois la formation de sarcomes induits par carcinogène et l'apparition spontanée de carcinomes épithéliaux [22]. En parallèle, des études complémentaires sont venues enrichir la connaissance du fonctionnement et des effecteurs de l'immunosurveillance avec la démonstration de l'importance de la perforine, des cellules NKT et des cellules T $\gamma\delta$ dans la protection contre la carcinogénèse [23] [24] [25].

1. La phase d'élimination

1.1 Développement de tumeurs chez des souris immunodéficientes

L'immunité anti-tumorale est soutenue par de nombreuses constatations expérimentales murines. Il existe à ce jour trois modèles de cancer chez la souris, appropriés à l'examen de "l'immunoediting" du cancer : les tumeurs induites par un carcinogène, des tumeurs spontanées qui surviennent lors du vieillissement et le développement de tumeurs chez des souris génétiquement prédisposées au cancer. Ainsi, il a été démontré dans ces modèles que divers types cellulaires, notamment les cellules T $\alpha\beta$, T $\gamma\delta$, les cellules NKT et NK mais aussi les éosinophiles ainsi que les molécules effectrices : perforine, TRAIL, ou encore les cytokines IFN- γ et IL-12 étaient impliqués dans les processus d'élimination et "d'immunoediting" des tumeurs (tableaux 1, 2 ,3). Ces observations démontrent donc un rôle essentiel des cellules provenant à la fois des systèmes immunitaires innés et adaptatifs dans l'élimination des tumeurs induites, spontanées et provenant de modèles génétiques. Enfin, il est important de rappeler que des variations existent au niveau de certains effecteurs mais ces différences pourraient être expliquées par des niveaux de régulation de l'immunité et de tolérance spécifiques à chacun de ces modèles expérimentaux [26].

Tableau 1. Sensibilité à l'induction tumorale par un carcinogène de souris immunodéficientes. (Adapté de Vesely MD *et al.*, Annu.Rev.Immunol. 2011)

Sensibilité à l'induction tumorale par un carcinogène de souris immunodéficientes			
Génotype	Déficit immunitaire	Observations	Références
<i>Rag1</i> ^{-/-} ou <i>Rag2</i> ^{-/-}	Cellules T, cellules B, Cellules NKT	↑ Sarcomes induits par MCA	[27, 28]
<i>Ifng</i> ^{-/-}	IFN- γ	↑ Sarcomes induits par MCA et des tumeurs cutanées ↑ Lymphomes induits par MNU	[29, 30]
<i>Stat1</i> ^{-/-}	Insensibilité à l' IFN- α , IFN- β , IFN- γ	↑ Sarcomes induits par MCA	[22]
<i>Pfp</i> ^{-/-}	Perforine	↑ Sarcomes induits par MCA	[29]
<i>Cd80</i> ^{-/-} <i>Cd86</i> ^{-/-}	CD80 and CD86	↑ Tumeurs cutanées induites par rayons UV	[31]
Déplétion NK1.1	Cellules NK et cellules NKT	↑ Sarcomes induits par MCA	[32]
Transgéniques RAE1	Signalisation NKG2D	↑ Tumeurs cutanées induites par DMBA/TPA	[33]
<i>Trail</i> ^{-/-}	TRAIL	↑ Sarcomes induits par MCA	[34]
<i>Il12a</i> ^{-/-}	IL-12	↑ Tumeurs cutanées induites par DMBA/TPA ↑ Lymphomes induits par MNU	[30, 35]
<i>Ccl11</i> ^{-/-} <i>Il5</i> ^{-/-}	Eosinophiles	↑ Sarcomes induits par MCA	[36]
<i>Tcrb</i> ^{-/-}	Cellules T $\alpha\beta$	↓ Sarcomes induits par MCA	[25]
<i>Cd1d</i> ^{-/-}	Cellules T-dépendantes de CD1d	↑ Sarcomes induits par MCA	[37]
<i>Tcrd</i> ^{-/-}	Cellules T $\gamma\delta$	↑ Sarcomes induits par MCA	[25]

Tableau 2. Développement de tumeurs spontanées de souris immunodéficientes. (Adapté de Vesely MD *et al.*, Annu.Rev.Immunol. 2011)

Développement de tumeurs spontanées de souris immunodéficientes			
Génotype	Déficit immunitaire	Observations	Références
<i>Rag2</i> ^{-/-} <i>Stat1</i> ^{-/-}	Cellules T, cellules B, Cellules NKT; insensibilité à l'IFN-α, IFN-β, IFN-γ	Adénomes intestinaux Adénocarcinomes mammaires	[27]
<i>Ifng</i> ^{-/-}	IFN-γ	Lymphomes et adénocarcinomes pulmonaires	[38]
<i>Pfp</i> ^{-/-}	Perforine	Lymphomes	[32]
<i>Trail</i> ^{-/-}	TRAIL	Lymphomes	[39]
<i>Lmp2</i> ^{-/-}	Apprêtement antigénique	Néoplasmes utérins	[40]
<i>gld</i> mutant	Mutant FasL	Plasmocytomes	[41]
<i>Il12rb2</i> ^{-/-}	IL-12Rβ2	Plasmocytomes et carcinomes pulmonaires	[42]

Tableau 3. Augmentation de la fréquence des cancers dans des modèles génétiques murins immunodéficients. (Adapté de Vesely MD *et al.*, Annu.Rev.Immunol. 2011)

Augmentation de la fréquence des cancers dans des modèles génétiques murins immunodéficients			
Génotype	Déficit immunitaire	Observations	Références
<i>Ifngr1</i> ^{-/-} <i>Trp53</i> ^{-/-}	Insensibilité à l'IFN-γ (Absence de p53)	Développement d'un spectre plus large de tumeurs que pour les souris <i>Trp53</i> ^{-/-}	[22]
<i>Stat1</i> ^{-/-} <i>Trp53</i> ^{-/-}	Insensibilité à l'IFN-α, IFN-β, IFN-γ (Absence de p53)	Développement d'un spectre plus large de tumeurs que pour les souris <i>Trp53</i> ^{-/-}	[22]
<i>Pfp</i> ^{-/-} <i>Trp53</i> ^{+/-}	Perforine (Hétérozygotie pour p53)	Développement de lymphomes à cellules B plus précocément que pour les souris <i>Trp53</i> ^{+/-}	[32]
<i>Pfp</i> ^{-/-} Her2/neu	Perforine (Fond génétique Her2/neu)	Développement d'adénocarcinomes mammaires plus précocément que pour les souris Her2/neu	[43]
<i>Ja18</i> ^{-/-} TRAMP	Semi-invariant Va14-ja résultant en l'absence de cellules NKT (Fond génétique TRAMP)	Développement de carcinomes plus agressifs et plus précoces que pour les souris TRAMP	[44]
<i>Trail</i> ^{-/-} <i>Trp53</i> ^{+/-}	TRAIL (Hétérozygotie pour p53)	Développement de lymphomes et de sarcomes plus précocément que pour les souris <i>Trp53</i> ^{+/-}	[39]
<i>Klrk1</i> ^{-/-} TRAMP	NKG2D (Fond génétique TRAMP)	Développement plus important de carcinomes de la prostate et plus précoce que pour les souris TRAMP	[45]

Abréviations: *cd*, cluster of differentiation; *Ifn*, interferon; *Il*, interleukin; MCA, methylcholanthrene; MNU, N-methyl-N-nitrosourea; NK, natural killer; NK1.1, NK cell-associated antigen 1.1; NKG2D, NK group 2, member D; NKT, natural killer T; *Pfp*, perforine; RAE, retinoic acid early transcript; *Rag*, recombination activating gene; *Stat1*, signal transducer and activation of transcription 1; *Tcr*, T cell receptor; TPA, 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate; *Trail*, TNF-related apoptosis-inducing ligand UV, ultraviolet. FasL, Fas ligand; *gld*, generalized disease mutant mice; *Il12rb2*, interleukin-12 receptor subunit β2; *Lmp2*, low-molecular-mass protein 2. Her2/neu, human epidermal growth factor receptor 2; *Ja18*, *Ja18* joining gene segment of TCR; *Klrk1*, killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1; *Mlh1*, mutL homolog 1; TRAMP, transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate; *Trp53*, transformation related protein 53.

1.2 La phase d'élimination : arguments cliniques, statistiques et histologiques

Chez l'Homme, les preuves d'une surveillance du cancer par le système immunitaire sont apportées par plusieurs observations cliniques et arguments histologiques.

Très tôt, de nombreuses études ont suggéré que les personnes immunodéficientes, des patients transplantés sous traitements immunosuppresseurs [46] ou des individus avec des immunodéficiences primaires [47], présentaient un risque relatif de développement tumoral significativement plus élevé. Une corrélation positive entre la durée d'immunosuppression induite pharmacologiquement et l'incidence des cancers étaye en outre l'existence d'une immunosurveillance du cancer chez l'Homme [48]. La prévalence du cancer chez les grands greffés a été observée dans une gamme de situations de transplantation en utilisant une variété d'immunosuppresseurs. Ainsi, les patients recevant des greffes de rein présentent une incidence globale de malignité trois fois supérieure à la population générale. Bien que les tumeurs malignes associées aux virus prédominent, il y a aussi un risque accru de développer des cancers coliques, pulmonaires, pancréatiques, rénaux, endocriniens, [49], ORL, vésicaux ou des mélanomes malins *de novo*, approximativement quatre fois plus important que celui de la population générale au même âge [50]. Beaucoup de cancers (lymphomes non Hodgkiniens, sarcomes de Kaposi, carcinomes génito-urinaires) ont cependant une étiologie virale et sont liés à des infections par le virus d'Epstein-Barr, le herpèsvirus humain 8 ou encore les papillomavirus humains oncogènes. Ces pathologies malignes ont une fréquence d'apparition plus élevée chez les patients atteints du virus d'immunodéficiência humaine (VIH) [51]. L'incidence des tumeurs non virales chez les patients atteints du VIH est moins documentée. Toutefois, des preuves d'une fréquence accrue des cancers solides ont été apportées, particulièrement pour les adénocarcinomes pulmonaires [52], et cela indépendamment de la consommation tabagique [53]. En outre, il a été montré chez des patients porteurs de mutations dans les deux allèles du gène de la perforine (PRF1), conduisant à une lymphohistiocytose hémophagocytaire familiale, que 50% d'entre eux développent au moins une hémopathie maligne avant l'adolescence, suggérant un rôle éventuel de la perforine dans la protection contre les hémopathies malignes chez l'Homme [54].

Des preuves cliniques soutiennent aussi la théorie de la phase d'équilibre de l'immunoediting [26]. Tout d'abord, il faut noter l'existence d'une réponse immunitaire contre les cellules pré-néoplasiques, retrouvées dans les gammopathies monoclonales de signification indéterminée (MGUS) ou dans les myélomes indolents. Le contrôle par le

système immunitaire de ces cellules qui peuvent éventuellement évoluer vers un myélome multiple est compatible avec la phase d'équilibre [55]. Du reste, une multitude d'observations cliniques suggèrent que les cancers puissent rester quiescents chez les patients pendant de nombreuses années, dépassant parfois 20 ans, avant que la pathologie maligne ne progresse à des niveaux cliniquement décelables [56]. A titre d'exemple, 20-45% des patients atteints de cancer du sein ou de la prostate rechutent, souvent des décennies plus tard [57] [58]. Le délai prolongé entre la rémission du cancer initial et la récurrence peut, en partie, s'expliquer par des contraintes immunologiques sur les cellules cancéreuses persistantes. Cette maladie résiduelle minimale a une importance majeure car la grande majorité de la morbidité et la mortalité associée au cancer est imputable à des lésions métastatiques provenant de cellules souches cancéreuses [3].

La corrélation positive entre la fréquence des lymphocytes infiltrant les tumeurs (TILs) et la survie des patients sous-tend l'importance de l'immunité anti-tumorale. L'association initiale entre le pronostic favorable du patient et les TILs a d'abord été observée chez les patients atteints de mélanome [59] où il a été signalé que des niveaux élevés de cellules T CD8 + infiltrant étaient corrélés à une meilleure survie des patients que ceux avec un faible nombre de lymphocytes. Dès lors, divers antigènes spécifiques des mélanomes ont été identifiés [60]. Toutefois, les lymphocytes T CD8+ ne sont pas les seules cellules infiltrantes associées à une amélioration du pronostic, on retrouve aussi les cellules NK, ou les cellules NKT dans différents types de tumeurs solides dont les tumeurs ovariennes [61] et coliques [62]. Enfin, dans certains cas rares, il a été observé des régressions spontanées de tumeurs associées à un infiltrat de cellules immunitaires au sein par exemple de carcinomes de peau infiltrés par des lymphocytes T CD4+ [63] ou encore de lymphomes [64] et de tumeurs pulmonaires [65].

Concernant les cancers colo-rectaux, on peut également souligner les résultats des travaux de J.Galon et de son équipe (Fig1). Des analyses provenant de larges cohortes de patients ont pour la première fois, démontré que le système immunitaire adaptatif pouvait prévenir les premiers signes d'apparition de l'invasion métastatique que constituent les embolus tumoraux intra-vasculaires. En effet, ils ont détecté au sein de tumeurs colorectales précoces des marqueurs d'une réponse cytotoxique anti-tumorale et notamment l'expression de Granzyme B/Granulysine et de plusieurs marqueurs d'activation, de différenciation, de migration et de mémoire des cellules T [66]. En outre, ils ont démontré que l'orientation fonctionnelle, la densité et la localisation au sein de la tumeur de l'infiltrat immunitaire étaient des déterminants du pronostic de survie et de récurrence du patient. Ainsi, ils proposent

que l'analyse *in situ* de l'infiltrat immunitaire d'une tumeur puisse être utilisée en tant qu'outil pronostic chez les patients [67].

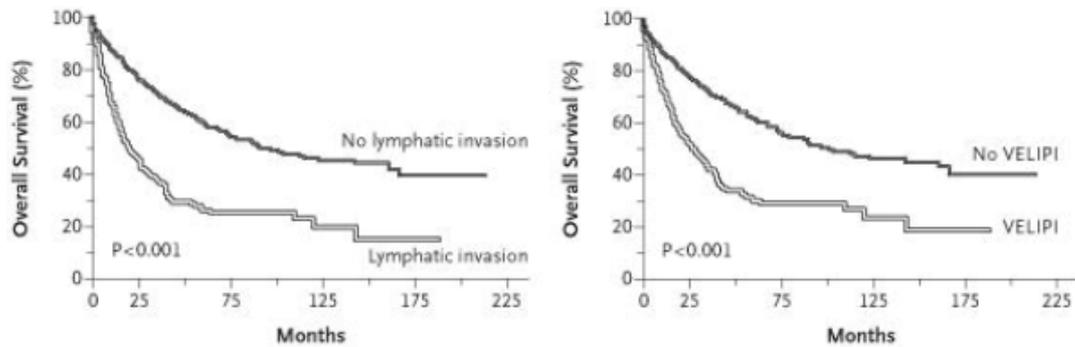


Fig1. Courbes de survie globale (Kaplan–Meier) en présence ou en absence d’invasion lymphatique et d’invasion métastatique précoce (VELIPI) par des lymphocytes T (CD45 RO+), chez 959 patients atteints de cancer colorectal. (Pagès et al, N Engl J Med 2005)

Toutefois, l'infiltration tumorale par certains leucocytes, tels que les macrophages et les T_{regs} (T régulateurs), a parfois un impact négatif sur la survie des patients [68]. Un désaccord existe néanmoins concernant l'importance des cellules T_{regs} dans les tumeurs, certains groupes ont corrélé la présence de cellules T_{regs} Foxp3 + à un mauvais pronostic pour les cancers ovariens et du pancréas [69] [70], tandis que d'autres groupes ont signalé un meilleur pronostic des individus ayant des cellules T_{regs} dans les échantillons de tissus tumoraux de colon et de cancer ORL [71] [72]. Les raisons de ces différents résultats ne sont pas claires mais peuvent être liées au type de tumeur maligne impliquée. Les macrophages sont aussi très souvent retrouvés parmi l'infiltrat leucocytaire des tumeurs solides. Ils sont présents dans une diversité de cancers chez l'Homme dont les cancers du colon, les mélanomes, les cancers du rein, du poumon, de l'ovaire et du sein [73].

1.3 Immunité innée et adaptative anti-tumorale

1.3.1 Reconnaissance : antigènes tumoraux et signaux de danger

Bien que les tumeurs dérivent des cellules du « soi », elles sont caractérisées par une grande instabilité génétique à l'origine de la formation de nouvelles protéines (néoantigènes) ou de l'expression ectopique ou anormalement élevée de molécules qui les rendent différentes du « soi ». Un des éléments essentiels à l'immunothérapie serait la découverte d'un antigène tumoral idéal, c'est à dire, exprimé de façon stable par la tumeur, absent des tissus normaux et indispensable à la survie de la cellule cancéreuse. Un tournant décisif dans cette recherche a été l'adoption d'une approche appelée *autologous typing* dans laquelle les cellules tumorales et normales provenant d'un patient sont utilisées comme cibles pour la reconnaissance immunitaire spécifique par des anticorps et des lymphocytes T CD8+ propres à ce même patient [74] [75]. Grâce à cette technique et l'utilisation de clonage génétique dans des bibliothèques de cosmides [76], plusieurs molécules clés, et notamment une famille d'antigènes spécifiques, ont été identifiées comme étant des antigènes tumoraux : les antigènes "cancer-testicules" (CTA). Il s'agit de protéines exprimées par les cellules tumorales de différents types histologiques mais absentes des cellules normales, à l'exception des cellules germinales et des trophoblastes [60], révélant un rôle important de la ré-activation du programme gamétogénétique normalement silencieux dans les cellules somatiques, dans la tumorigénèse [77]. La liste des CTA a été ensuite considérablement élargie par le développement d'une technique plus aboutie, développée par Pfreundschuh et ses collègues [78]. Ils ont réussi à identifier plus de 20 CTA différents grâce à des bibliothèques d'expression d'ADNc phagique recombinant et l'immunocriblage des sera autologues des patients [79].

Les principaux antigènes tumoraux reconnus comme étrangers par le système immunitaire ont été classés en cinq catégories et résumés dans le tableau suivant.

Tableau 4. Classification des antigènes tumoraux définis. (Adapté de Srinivasan et Wolchok J Transl Med. 2004) [80]

Antigènes	Exemples	Références
"Cancer/testicules" (CTA)	MAGE, BAGE, GAGE, NY-ESO-1	[76, 81]
De différenciation	Tyrosinase, TRP1/gp75, TRP2, gp100, Melan-A/MART1, gangliosides, PSMA	[82-84] [85] [86, 87]
Mutationnels	p53, ras, β -caténine, CDK4, CDC27, α -actinine 4	[88, 89] [90, 91] [92, 93]
Surexprimés	HER2, WT1, EphA3, EGFR, CD20	[94-97] [98]
Universal antigens	Téломérase, Survivine	[99, 100]

Abréviations: Her2/neu, human epidermal growth factor receptor 2; Wilm's Tumor 1 (WT1) and Ephrin receptor (Eph3) proteins; prostate specific membrane antigen (PSMA); Tyrosinase Related Protein-1 (TRP)-1; MAGE Melanoma-associated antigen, gp glycoprotein.

Un autre mécanisme, récemment identifié, par lequel le système immunitaire inné discrimine les cellules normales des cellules transformées implique l'interaction du récepteur d'activation NKG2D (*natural killer group 2 member D*), exprimé sur les cellules NK, les cellules T $\gamma\delta$ et les cellules T CD8 $\alpha\beta$ avec des ligands spécifiques de la tumeur, induits par un stress génotoxique, une infection virale ou par transformation médiée chimiquement [101]. Chez l'Homme comme chez la souris, les ligands NKG2D ont un niveau d'expression faible dans les cellules normales et élevé dans les cellules tumorales ou infectées. Ces ligands sont répartis en deux grandes familles de protéines, structurellement proches des molécules du CMH de classe I mais n'interagissant pas avec la $\beta 2$ microglobuline: les familles MIC (*MHC class I chain-related proteins A and B*) et RAET-1. La famille MIC : MICA, MICB et ULBPs (*UL16 binding proteins*) est retrouvée exclusivement chez l'Homme, la famille RAET-1 (*retinoic acid early transcript 1*) est en revanche présente dans les deux espèces [102]. MICA/B sont des protéines fréquemment exprimées à la surface des carcinomes primaires du poumon, du rein, des ovaires, du colon [103] et du foie [104] mais aussi des mélanomes [105]. Chez la souris, NKG2D se lie aux protéines Rae-1, à l'antigène mineur d'histocompatibilité H60 [106] [107] et à MULT1 (*mouse UL16 binding protein-like transcript 1*) [108]. L'expression de ces trois ligands de NKG2D a été observée dans un large panel de tumeurs murines et est suffisante pour induire le rejet de plusieurs tumeurs transplantables [109].

1.3.2 Mécanismes et effecteurs des réponses immunitaires innée : NK, NKT, T $\gamma\delta$ et adaptative : CD4, CD8, IFNs

Le processus d'élimination des cellules tumorales comprend l'activation de réponses immunitaires innées et adaptatives. Pour la réponse immunitaire innée, plusieurs cellules effectrices telles que les cellules NK, NKT et les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont activées par les cytokines inflammatoires (TNF- α , TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12) libérées par les cellules tumorales naissantes, les macrophages et les cellules stromales qui entourent les cellules tumorales [110]. Les cytokines secrétées recrutent de nombreuses cellules immunitaires qui vont à leur tour produire des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 et l'IFN- γ . La lyse des cellules tumorales par les cellules NK relargue ensuite des antigènes tumoraux qui vont permettre une réponse immunitaire adaptative [32] [111] [112]. Les cellules NK vont promouvoir la maturation et la migration des cellules dendritiques (DCs) aux nœuds des ganglions lymphatiques drainants (TDLNs) améliorant ainsi la présentation antigénique aux cellules T naives pour l'expansion clonale des lymphocytes T cytotoxiques (CTLs). Les lymphocytes T spécifiques des antigènes tumoraux sont recrutés au niveau du site tumoral primaire et tuent directement les cellules tumorales [113].

En outre, les 4 phases suivantes ont été proposées pour le processus d'élimination :

1- Reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire inné : lorsqu'une tumeur solide atteint plus de 2-3mm, elle requiert un afflux sanguin supplémentaire et un remodelage stromal pour poursuivre la progression tumorale. Cet environnement induit des signaux pro-inflammatoires conduisant au recrutement des cellules NK, NKT, T $\gamma\delta$, des macrophages et des DCs au site tumoral [114] [115]. Les cellules transformées exprimant les antigènes tumoraux précédemment cités peuvent être reconnues par ces cellules productrices d'INF γ [116].

2- Maturation et migration des DCs et présentation croisée aux cellules T : l'IFN- γ exerce un contrôle des tumeurs via des effets anti-prolifératifs [117], angio-statiques [118] et pro-apoptotiques [119]. Certaines chimiokines provenant de la tumeur et des tissus non tumoraux du microenvironnement comme CXCL10 (IP10), CXCL9 (MIG) et CXCL11 (I-TAC) bloquent la néovascularisation de la tumeur, tout en continuant à induire la mort des cellules tumorales [120]. Les cellules tumorales nécrotiques sont ingérées par les DCs immatures (IDC) qui ont mûri en présence de molécules pro-inflammatoires et ont migré vers les TDLNs.

3- Production de cellules T spécifiques des antigènes tumoraux:

Les cellules NK infiltrant la tumeur et les macrophages producteurs d'IL-12 et d'IFN- γ vont détruire les cellules tumorales par l'activation de mécanismes cytotoxiques comme la perforine, TRAIL et la production de ROS (*reactive oxygen species*) [121] [122]. Dans les TDLNs, les DCs présentent les antigènes tumoraux aux cellules T CD4+ naives qui se différencient en cellules T CD4+ permettant le développement des lymphocytes T CD8+ spécifiques des antigènes tumoraux et leur expansion clonale.

4- Migration des cellules T CD4+, CD8+ spécifiques des antigènes tumoraux au site primaire tumoral, élimination des cellules par les CTLs, amplifiée par l'IFN- γ et sélection des cellules de faible immunogénicité [27] [123].

2. La phase d'équilibre

De manière générale, une phase de latence prolongée est fréquemment observée dans le développement tumoral et la notion de phase d'équilibre de l'immunoediting est venue compléter un ancien concept déjà connu qu'est la quiescence tumorale [124]. L'état de dormance du cancer reste toutefois mal compris même si de nombreuses données cliniques (précédemment citées) soutiennent son existence. L'implication de divers mécanismes a cependant été mise en évidence, comme la quiescence cellulaire « intrinsèque » (arrêt en phase G0-G1) ou encore la dormance angiogénique « extrinsèque », au cours de laquelle la prolifération est compensée par l'apoptose (dûe à une faible vascularisation limitant l'apport de sang). Ces mécanismes de dormance tendent à favoriser un échappement au contrôle par le système immunitaire, mais il est aussi envisageable que la faible prolifération tumorale (infraclinique) soit le fait d'une activation du système immunitaire faisant intervenir des cellules T CD8+, de l'IFN- γ et des anticorps qui maintiendrait la croissance tumorale. Récemment, de petites lésions inertes contenant des cellules tumorales en phase d'équilibre ont été mises en évidence par MJ Smyth [125]. De plus, il a été observé que les tumeurs dormantes ne se développaient dans des hôtes immunocompétents qu'après déplétion de lymphocytes T ou neutralisation de l'IL-12 ou de l'IFN- γ par des anticorps monoclonaux. En revanche, aucun effet n'a été remarqué avec la déplétion des cellules NK ou la neutralisation des signalisations NKG2D et TRAIL. Morphologiquement, les cellules de la lésion en dormance ont montré des caractéristiques des cellules cancéreuses avec des noyaux élargis, des degrés variables d'atypie et la présence de cellules T CD3+, de cellules B220+ et de

phagocytes mononucléés F4/80+. Ces résultats suggèrent donc qu'une immunité adaptative, hautement spécifique est à l'origine du maintien en phase d'équilibre (Fig2) [126].

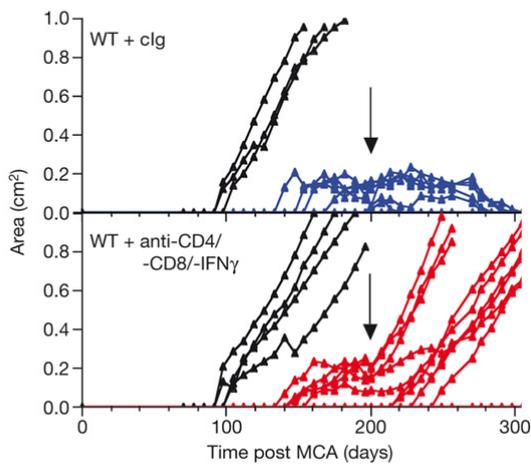


Fig 2. Le système immunitaire adaptatif maintient les sarcomes MCA induits à l'état d'équilibre. 16 souris C57BL/6 WT ont été traitées par 25 µg de MCA. A partir du jour 200, 13 souris sans tumeur ont été traitées hebdomadairement par des immunoglobulines contrôles et 15 souris sans tumeurs ont été traitées par des anticorps anti-CD4/-CD8/-IFN- γ . (Koebel CM *et al*, Nature 2007)

3. La phase d'échappement

Une fois la théorie d'immunosurveillance du cancer admise, il a fallu comprendre pourquoi les cancers apparaissent chez des individus immunocompétents. L'explication la plus vraisemblable a été que le système immunitaire, lors de la formation tumorale pouvait sélectionner des variants ayant une meilleure capacité de survie dans un environnement immunologiquement intact (un comportement retrouvé avec les bactéries, virus et parasites). Des études sont venues corroborer cette hypothèse puisque 40% des tumeurs de souris RAG2^{-/-} ont été rejetées dans des hôtes immunocompétents alors que la totalité des tumeurs provenant des souris WT ont eu une croissance graduelle, ce qui signifie que des tumeurs formées en absence de système immunitaire intact sont plus immunogènes que celles provenant d'hôtes immunocompétents (Fig3) [27].

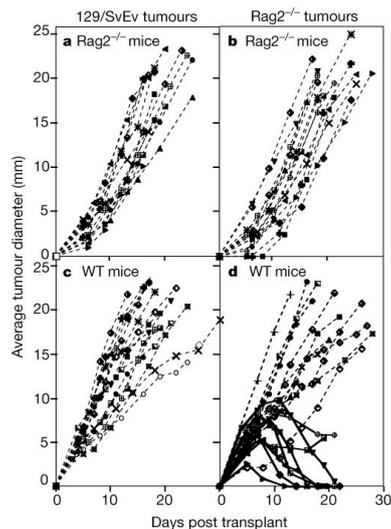


Fig 3. Immunogénicité accrue des tumeurs provenant de souris RAG2^{-/-} traitées par MCA. Croissance tumorale dans des souris immunodéficientes RAG2^{-/-}, inoculées avec des cellules provenant de 17 souris sauvages 129/SvEv (a) ou de 20 souris RAG2^{-/-} (b). (Shankaran V *et al*, Nature. 2001)

Ainsi, comme le système immunitaire peut paradoxalement favoriser la croissance de tumeurs susceptibles d'échapper à sa propre détection, l'immunosurveillance du cancer n'est plus le terme adéquat pour décrire le concept qui, dans sa forme originale impliquait seulement les phases initiales de la transformation cellulaire et un rôle purement protecteur. Est apparu alors la notion "d'immunoediting" du cancer, terme décrivant à la fois des mécanismes continus lors du développement tumoral, de protection et de sculpture de la réponse immunitaire.

La théorie "d'immunoediting" des tumeurs ainsi élaborée (Fig 4), fait donc intervenir 3 phases appelées les 3 « Es » du cancer : Elimination, Equilibre et Echappement [127] [126]. Pendant la phase d'élimination, les systèmes immunitaires innés et adaptatifs travaillent de concert pour détruire la tumeur bien avant sa détection au niveau clinique. En revanche, si une cellule cancéreuse variante n'est pas éliminée pendant cette phase, sa croissance peut être maintenue en quiescence fonctionnelle par les cellules T, l'IL-12 et l'IFN- γ , c'est la phase d'équilibre. Mais suite à une pression de sélection Darwinienne des cellules tumorales génétiquement instables, des variants peuvent émerger (modification des antigènes tumoraux ou défaut dans l'apprêtement antigénique) et n'être plus reconnus par le système immunitaire adaptatif. On peut aussi envisager qu'une insensibilité aux mécanismes d'action des effecteurs immunitaires ou que l'induction d'un état immunosuppresseif du microenvironnement puisse être à l'origine de la phase d'échappement.

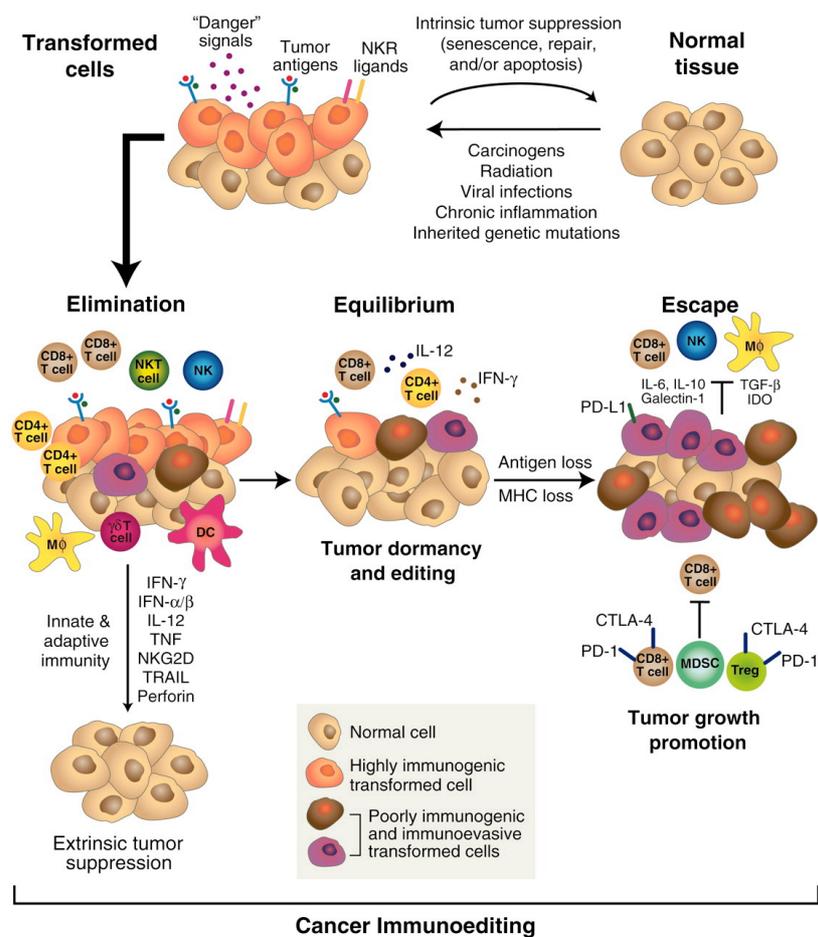


Fig 4. Immunoediting du cancer : rôle du système immunitaire dans la suppression et la promotion du cancer. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Science. 2011 Précocément dans le développement tumoral, des signaux de danger comme les IFN de type I, des "DAMPs" comme HMGB1 ou des molécules de surface vont activer les immunités innées et adaptatives pour détecter et détruire la tumeur avant qu'elle ne devienne cliniquement décelable. Des variants cellulaires ayant survécu à la phase d'élimination vont rentrer dans la phase d'équilibre ou seule l'immunité adaptative, représentée par les cellules T, l'IL-12 et l'IFN- γ est nécessaire au leur maintien à l'état de dormance. Après une pression de sélection constante de ces cellules génétiquement instables, ces variants peuvent n'être plus reconnus par l'immunité adaptative, devenir insensibles aux mécanismes des effecteurs immunitaires ou induire un état immunosuppresseur au niveau du microenvironnement tumoral. Ces cellules tumorales vont alors entrer dans la phase d'échappement et promouvoir une croissance tumorale jusqu'à l'apparition clinique de la pathologie.

Très récemment, les travaux de l'équipe du Dr Scriber ont permis de prouver et d'identifier certains mécanismes responsables de l'élimination et de l'échappement tumoral. Ils ont mis en évidence qu'un mutant R913L de la spectrine- β 2 pouvait être un antigène de rejet des sarcomes murins d42m1. Ainsi, ils ont démontré que l'immunoediting du cancer se faisait par un processus d'immunosélection lymphocytes T-dépendant qui pouvait promouvoir la croissance de clones tumoraux pré-existants dépourvus du mutant spectrine- β 2, hautement antigénique. Ces résultats suggèrent que la forte immunogénicité d'une tumeur non éditée puisse être attribuée à l'expression de protéines mutantes très antigéniques pouvant conduire à son élimination (1^{ère} phase de la théorie). Et à l'inverse que l'échappement par le système immunitaire (3^{ème} phase de la théorie) serait dû à un processus d'immunosélection dépendant des cellules T et permettant la croissance des cellules tumorales n'exprimant pas ces antigènes fortement immunogènes [128].

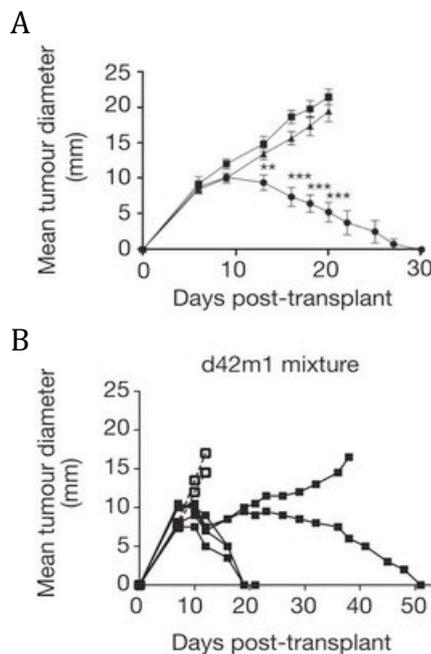


Fig 5. Le mutant spectrine- β 2 est un antigène de rejet majeur des sarcomes MCA induits d42m1.

A. Croissance de cellules tumorales d42m1-ES3, transduites avec la forme sauvage (n = 5, carrés) ou mutante de la spectrine- β 2 (n = 5, cercles) et de cellules contrôles d42m1-ES3 (n=5, triangles) B. Croissance d'un mélange de 95% de cellules d42m1-T2 (spectrin- β 2⁺) et de 5% de cellules d42m1-T3 (spectrin- β 2⁻) après transplantation dans des souris de type sauvage (n = 5, lignes solides, carrés pleins) ou des souris Rag2^{-/-} (n = 2, lignes en pointillés, carrés vides). (Matsushita H *et al*, Nature 2012)

En réalité, les cellules tumorales peuvent échapper à la détection soit par un manque de reconnaissance immunologique soit grâce à l'induction d'une tolérance centrale ou périphérique. En outre, dans un modèle de cancer murin clonal et d'apparition sporadique reflétant un long processus de transformation maligne, plus proche des cancers humains. G. Willimsky et T. Blankenstein ont montré que les tumeurs même hautement immunogènes n'étaient pas capables d'induire une production de lymphocytes T cytotoxiques fonctionnels

mais ont observé l'induction d'une tolérance à la persistance des antigènes tumoraux [129]. La tolérance centrale est un processus par lequel les cellules T auto-réactives sont éliminées ou converties en cellules T_{regs} dans le thymus [130]. Dans ce cas et en l'absence d'expression de néoantigène, les tumeurs peuvent demeurer invisibles pour le système immunitaire adaptatif et sont libres de se développer sans entrave. La tolérance périphérique est un processus important par lequel les cellules T réagissant avec des antigènes du soi, non exprimés dans le thymus, sont supprimées ou rendues non réactives en périphérie. Dans ce cas, un certain niveau de réponse immunitaire anti-tumorale peut être initié de façon transitoire et cela avant que l'induction de la tolérance ne conduise à la progression tumorale [131].

En plus de l'induction de tolérance, les cellules tumorales peuvent acquérir des défauts d'apprêtement de l'antigène et de voies de présentation facilitant l'évasion de la reconnaissance immunitaire adaptative. Dans les années 2000, il a été décrit que la perte ou la sous-régulation de différentes molécules liées à la reconnaissance antigénique constituait un mécanisme d'échappement (souvent utilisé par les microorganismes). Ainsi, que ce soit chez l'Homme ou la souris, une perte des molécules de classe I du CMH à la surface des cellules cancéreuses, après une réponse partielle à une immunothérapie à base de cellules T ou dans des tumeurs récurrentes de souris immunisées a été observée [132] [133]. Mais encore, la perte de TAP-1 (composant de la machinerie intracellulaire qui facilite l'apprêtement et la présentation antigénique), de la β 2 microglobuline, de LMP2, de LMP7 et le développement d'insensibilité à l'IFN- γ ou l'IFN- α/β par les cellules tumorales, empêche l'élimination par réponse à médiation cellulaire, conduisant de ce fait à une progression tumorale [134] [135]. Une version extrême de ce processus d'évasion se produit lorsque les tumeurs perdent la capacité de réponse à l'IFN- γ , soit par mutation soit par inactivation épigénétique des gènes codant pour des composants de la signalisation du récepteur de l'IFN- γ (IFNGR1, IFNGR2, JAK1, JAK2, et STAT1) [136]. De même, les tumeurs peuvent devenir méconnaissables par les cellules du système immunitaire inné, par la perte de ligands pour les récepteurs effecteurs des cellules NK, les récepteurs NKG2D [137] ou par l'activation constitutive de la signalisation Stat-3 qui supprime l'expression des signaux de danger pro-inflammatoires permettant la maturation des cellules dendritiques (DCs) [138].

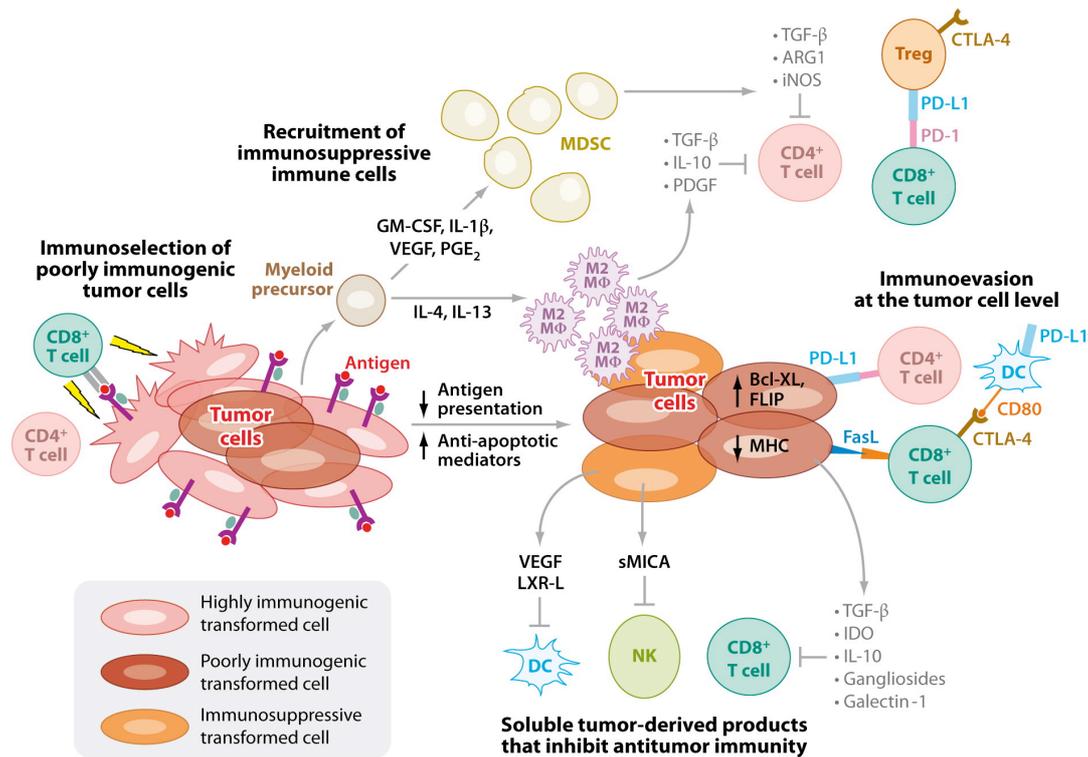


Fig 6. Mécanismes d'échappement tumoral. (Vesely MD *et al*, Annu. Rev. Immunol 2011)

Abréviations: ARG1 arginase 1; CTLA-4 Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4; FasL Fas Ligand; GM-CSF Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor; IDO indoléamine 2,3-deoxygenase; iNOS Inductible Nitric Oxide Synthase; MDSC Myeloid-Derived Suppressor Cells; CMH Complexe Majeur d'Histocompatibilité; MICA MHC class I chain-related protein A; PDGF Platelet-Derived Growth Factor; PD-L1 Programmed cell Death Ligand 1; PGE2 prostaglandine-E2; TGF-β Transforming Growth Factor β; VEGF Vascular Endothelial Growth Factor.

Les tumeurs échappent ou inhibent le système immunitaire par des mécanismes intrinsèques et extrinsèques. Les altérations intrinsèques peuvent avoir lieu par régulation négative de la présentation antigénique (CMH), par régulation positive des inhibiteurs de l'apoptose (Bcl-XL, FLIP), ou par expression de molécules de surface qui tuent directement les cellules T cytotoxiques (PD-L1, FasL). En outre, les cellules tumorales sécrètent des facteurs qui inhibent les fonctions effectrices des cellules immunitaires (TGF-β, IL-10, le VEGF, LXR-L, IDO, gangliosides, ou MICA solubles [103] ou recrutent des cellules régulatrices générant des cytokines immunosuppressives (IL-4, IL-13, GM-CSF, l'IL1-β, de VEGF, ou de PGE2).

Plus précisément, la sécrétion d'IL-4 et d'IL-13 induit le recrutement et la polarisation des macrophages M2 (M2 MΦ) à partir de précurseurs myéloïdes. Ces macrophages associés aux tumeurs (TAM) sécrètent alors des molécules anti-inflammatoires, comme l'IL-10 et le TGF-β, qui inhibent les réponses Th1 anti-tumorales [139]. Ils favorisent ainsi la survie des cellules tumorales, leur prolifération et leur migration, notamment par la sécrétion de facteurs de croissance (ex: FGF, EGF) et la dégradation de la matrice extracellulaire (MMP) [140].

Les TAM sont donc fortement impliqués dans le phénomène de perpétuelle cicatrisation qui caractérise certaines tumeurs [141].

Les cellules T CD4⁺ CD25⁺ régulatrices (T_{regs}) peuvent aussi inhiber les cellules T effectrices spécifiques des antigènes tumoraux par le biais de multiples mécanismes, y compris l'expression de CTLA-4. Ces cellules sont associées à une progression tumorale, dans les cancers du poumon, du pancréas et du sein [142] [143] et sont corrélées à un mauvais pronostic dans les cancers de l'ovaire, du sein et du foie [144]. Chez les patients atteints de cancer de l'ovaire, des T_{regs} sont retrouvés dans l'ascite et dans la tumeur, majoritairement dans les stades avancés de la maladie [69]. Les T_{regs} sont attirés à la tumeur par la chimiokine CCL22, sécrétée par les macrophages de l'ascite et les cellules tumorales elles mêmes.

Le caractère métastatique des cancers du sein chez certaines patientes a été corrélé à la présence de cellules myéloïdes immatures (MDSC), mélange hétérogène de macrophages et de cellules dendritiques non fonctionnelles, comme l'atteste leur faible capacité à présenter les antigènes et à stimuler des lymphocytes T [145]. Le relargage d'IL-1 β , de VEGF ou de PGE2 (prostaglandines) peut entraîner l'accumulation de ces MDSC qui peuvent inhiber la fonction des cellules T en exprimant du TGF- β (*transforming growth factor β 1*) de l'ARG1 et de l'iNOS [146].

CONCLUSION PARTIE 1

Les tumeurs chimiquement induites ont joué un rôle essentiel dans l'histoire de l'immunologie tumorale. Elles sont à l'origine de la controverse sur l'importance d'un contrôle immunologique de la croissance tumorale. Mais elles ont aussi permis de fournir la preuve de l'existence d'antigènes tumoraux spécifiques et par la suite, la première démonstration du concept en trois phases de l'*immunoediting* du cancer. Cette controverse a contribué à ce que le NCI (*National Cancer Institute*) néglige l'importance du système immunitaire dans l'efficacité des traitements. En outre, dans les premiers âges des thérapies anticancéreuses, les marqueurs tumoraux spécifiques n'étant pas disponibles, les agents antinéoplastiques conventionnels (y compris les produits chimiques endommageant l'ADN, les anthracyclines, les antimétabolites, les poisons du fuseau mitotique et d'autres agents) ont été sélectionnés pour leur capacité à tuer les cellules fortement prolifératives, l'une des propriétés les plus courantes des cellules tumorales [4]. De fait, cette cytotoxicité peut avoir des effets immunosuppresseurs notables, soit directement en inhibant ou détruisant les cellules effectrices du système immunitaire soit indirectement en induisant une anergie ou une

paralysie immunitaire. Néanmoins, les thérapies conventionnelles anticancéreuses peuvent aussi agir comme des immunostimulants par la subversion des mécanismes immunosuppresseurs et par stimulation directe ou indirecte des effecteurs du système immunitaire. Ainsi, la radiothérapie et certaines chimiothérapies peuvent induire des réponses cellulaires rendant la mort des cellules tumorales immunogène, ce qui représente un atout majeur pour l'élimination tumorale et la surveillance d'éventuelles cellules tumorales résiduelles. L'immunogénicité des tumeurs mourantes est déterminée par une combinaison de facteurs, incluant les mécanismes d'induction de la mort, le niveau de mort cellulaire, l'environnement tumoral local et par conséquent la nature des cellules présentatrices d'antigènes, présentes lors du relargage des antigènes tumoraux. La connaissance de ces facteurs et la compréhension des mécanismes régulant le système immunitaire peuvent permettre d'empêcher la tolérance aux antigènes associés aux tumeurs et potentiellement être exploitées dans la conception d'immunothérapies efficaces contre le cancer [147].

II- Immunogénicité des cellules tumorales mourantes

A- Effets immunostimulants des thérapies anti-cancéreuses conventionnelles

Les chimiothérapies ont longtemps été associées au développement d'immunosuppression systémique, elles sont d'ailleurs utilisées en clinique pour diminuer les réponses immunitaires, pour le traitement par exemple, de maladies lymphoprolifératives ou pour la prévention des rejets de greffe. Cinq catégories d'agents sont ainsi utilisés, les radiations ionisantes, les corticostéroïdes, les agents alkylants, les sérums anti-lymphocytaires et les anti-métabolites [148]. Toutefois, des études récentes ont démontré qu'à des doses plus faibles, certains de ces mêmes traitements pouvaient induire une augmentation des réponses immunitaires anti tumorales (tableau n°5). Les propriétés immunostimulantes des chimiothérapies ou des radiothérapies n'ont pas été totalement élucidées. Toutefois, certaines sont associées à une augmentation de l'expression de molécules associées au stress provenant des cellules tumorales mourantes ou endommagées, comme les ligands de NKG2D, Fas ou les récepteurs de mort TRAIL et les HSPs qui rendent les cellules réceptives à des attaques directes par le système immunitaire inné, incluant les cellules NK, les cellules NKT et les cellules T $\gamma\delta$ [149].

Tableau 5. Classification des effets immunostimulants connus de thérapies anticancéreuses conventionnelles

Mode d'action	Traitement	Effets immunostimulants- Mécanismes d'action	Références
Modification de la structure de l'ADN	Formation de liaisons covalentes avec l'ADN	Agent alkylant : cyclophosphamide	↓ nombre/fonction des Tregs élimination sélective de populations immunosuppressives [150]
	Cassure de l'ADN	Sel de platine : oxaliplatine	Induction de MCI [151]
		Irradiation	↑ répertoire antigénique des cellules tumorales ↑ lyse induite par FasL ↑ expression de ligands de NKG2D ↑ lyse des cellules tumorales par les cellules NK, NKT, LT $\gamma\delta$, LT CD8 Induction de MCI [152] [153] [154] [155]
			Agents intercalants/ Inhibiteur de topoisomérases
	Anti-métabolites	5-FU gemcitabine	↓ prolifération cellules B (réponses humorales) ↑ Lyse par LT (réponses cellulaires) toxicité sélective contre les MDSCs ↑ expression des HSPs sur les cellules tumorales ↑ phagocytose par DCs [161] [162] [163] [164] [165]
Inhibiteur du protéasome	Inhibition protéolyse par la sous-unité 26S (signalisation NF-KB)	Bortezomib	↑ phagocytose par DCs ↑ exposition membranaire des HSP90 sur les cellules mourantes ↑ réponse antitumorale T [166] [167]
Inhibiteur de tyrosine kinase	inhibition Bcr-Abl tyrosine kinase	Imatinib mesylate	Induction réponse immunitaire cellules NK dépendante [168]
Sensibilisation à la lumière laser	Photofrin	thérapie Photodynamique	Induction de MCI, Maturation cellules dendritiques, relargage d'IL-1 β [169]
poison du fuseau mitotique	Inhibition de la dépolymérisation des microtubules	Taxanes : docetaxel paclitaxel	↓ fonctions Tregs Maturation des DCs production de cytokines inflammatoires (TNF- α , NO, COX-2) [170] [171]
	Destruction des microtubules	"Alcaloïdes de la pervenche" : vinblastine vincristine vinorelbine	Production d'IL-1 β , IL-6, IL-12 Réponses anti-tumorales CD8 Maturation des DCs [159]

B- L'apoptose immunogène ou mort cellulaire immunogène (MCI)

L'apoptose est un type de mort cellulaire physiologique, considéré comme immunologiquement silencieux, voire tolérogène [172]. Les cellules apoptotiques sont rapidement reconnues par les cellules phagocytaires en raison de la libération de divers signaux "Find Me" [173]. Une fois reconnues par les cellules phagocytaires, elles sont éliminées suite à l'exposition membranaire de plusieurs signaux « eat me », comme la phosphatidylserine, les opsonines, la lactoferrine [174] [175] et la suppression de signaux « don't eat me », comme les molécules CD31 et les molécules du système CD47/SIRPα qui préviennent la phagocytose des cellules vivantes exposant la calréticuline [176]. Ce processus de nettoyage n'induit pas de réponse immunologique majeure, grâce au relargage de signaux anti-inflammatoires comme l'IL-10, le TGF-β1, les PGE2 et les PAF (*platelet-activating factors*). La production de ces cytokines induit une différenciation des cellules T naives CD4⁺ en cellules T_{Regs} et cellules T helper 2 (T_H2) qui inhibent les réponses immunitaires pro-inflammatoires [177].

Le paradigme généralement accepté est que l'apoptose, forme physiologique de mort cellulaire, se produit en l'absence de motifs moléculaires associés au danger (DAMPs) et favorise une tolérance immunogène. À l'inverse, la nécrose qui résulte souvent de dommages non physiologiques entraîne une exposition des DAMPs et par conséquent une activation des effecteurs immunitaires et inflammatoires car les DAMPs possèdent le même type de récepteurs de reconnaissance que les PAMPs (motifs moléculaires associés aux pathogènes) [178]. Néanmoins, cette vision manichéenne de l'induction de l'immunogénicité est une simplification excessive car ce concept peut être remis en cause. En effet, il a été démontré que dans certains cas, les antigènes provenant de cellules apoptotiques pouvaient déclencher des réponses immunitaires efficaces [177] et qu'inversement la nécrose pouvait être exécutée de manière programmée et hautement régulée [175]. Ainsi, il apparaît désormais plus judicieux de concevoir que l'immunogénicité de la mort cellulaire est déterminée par l'induction de DAMPs et non par le type de mort cellulaire [179]. *In vivo*, l'apoptose immunogène a été mise en évidence grâce à des études montrant qu'une mort cellulaire dépendante des caspases pouvait produire une vaccination anti-tumorale, basée sur l'activation des DCs [155].

L'induction d'une immunité antitumorale efficace en réponse à la chimiothérapie (*in vitro* et *in vivo*) a été observée pour la première fois, dans des souris immunocompétentes, après traitement des cellules tumorales par une anthracycline, la doxorubicine (Fig7). Les cellules tumorales mourantes, injectées sans adjuvant, ont ainsi montré la capacité à provoquer une réponse immunitaire capable de réprimer la croissance des tumeurs inoculées ou d'induire une regression tumorale dans des modèles de néoplasies établis. Toutefois, bien que la doxorubicine et une autre chimiothérapie, la mitomycine C induisent toutes les deux une mort cellulaire apoptotique par activation des caspases, seule la mort cellulaire par doxorubicine s'est avérée immunogène [160]. Étonnamment, les différentes chimiothérapies ne sont pas équivalentes dans leur capacité à induire une mort immunogène des cellules cancéreuses. Sur 25 chimiothérapies testées pour l'induction d'une réponse immunitaire protectrice contre une ré-inoculation de cellules vivantes, seule quatre, l'oxaliplatine et trois anthracyclines se sont avérées efficaces. Et cela même si tous les agents étaient particulièrement cytotoxiques et équivalent dans leur capacité d'induction de l'apoptose [180] [181].

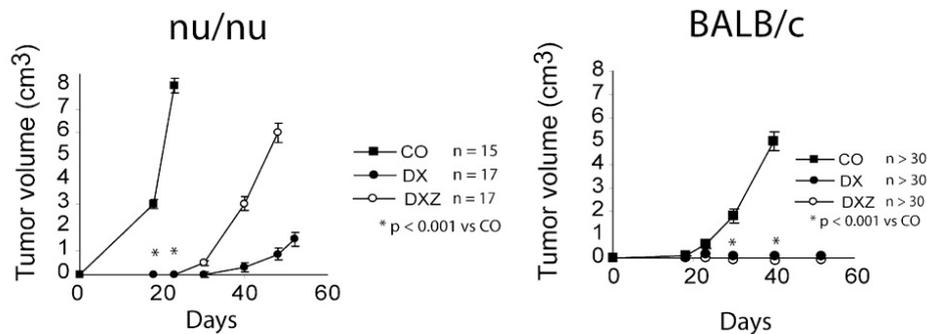


Fig 7. Comparaison des effets des anthracyclines sur l'évolution tumorale dans des souris immunodéficientes et immunocompétentes. Observation de l'induction d'une regression tumorale dans les souris immunodéficientes et d'une vaccination anti tumorale (protection prolongée) dans les souris immunocompétentes. (Casares N *et al.*, J Exp Med 2005)

En outre, d'autres études ont montré que de nombreux types de lignées cancéreuses chez la souris (y compris les cellules du cancer du côlon CT26, les fibrosarcomes MCA205, les cellules de cancer du sein TSA, la lignée GOS d'ostéosarcomes et les thymomes EL4) répondaient à une chimiothérapie à base d'anthracyclines ou d'oxaliplatine plus efficacement quand ils étaient implantés dans des souris syngéniques immunocompétentes que dans des hôtes immunodéficients [160]. Mais encore, il a été mis en évidence que la déplétion des

cellules T CD8 +, comme l'extinction du gène (KO) de l'IFN- γ ou de son récepteur réduisaient l'efficacité de la chimiothérapie de la même manière que l'extinction du gène de la recombinase Rag2 (absence de lymphocytes B et T, donc de l'immunité adaptative) [182]. Enfin, ces observations sont en lien avec des études cliniques révélant que les cellules T productrices d'IFN- γ sont des effecteurs efficaces de l'immunité anticancéreuse [183] [184].

Les cellules succombant à cette mort cellulaire immunogène vont subir certaines modifications définies par un modèle spatio-temporel précis. Celui-ci est caractérisé par la mise en place de signaux d'apparition séquentielle, dont le plus précoce est l'exposition à la surface membranaire de la protéine la plus abondante du réticulum endoplasmique, la calréticuline (CRT). Ensuite, à un stade apoptotique, la sécrétion du plus abondant métabolite intracellulaire, l'ATP et enfin à un stade post-apoptotique voire nécrotique secondaire, la libération d'un facteur pro-immunogène, la protéine non histone liant la chromatine, *High-mobility group protein B1* (HMGB1) peuvent déterminer si une mort cellulaire est immunogène lorsqu'ils apparaissent dans le microenvironnement des cellules mourantes.

C- Les chaperokines, calréticuline, HSP90, HSP70 : des signaux de danger (DAMPs) essentiels à la phagocytose des cellules mourantes

Plusieurs DAMPs ont récemment été identifiés comme étant indispensables à l'apoptose immunogène. Un de ces signaux « eat me » principaux est l'exposition à la surface cellulaire de la calréticuline (ecto-CRT) car l'extinction de son gène par siRNA anihile l'immunogénicité des cellules cancéreuses mourantes [155]. La calréticuline (CRT) est une protéine hautement conservée de 46 kDa, liant le Ca²⁺ et localisée principalement dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE). Elle possède diverses fonctions cellulaires comme l'activité chaperone, la régulation de l'homéostasie et de la signalisation calcique [175]. Dans le RE, la CRT interagit avec d'autres molécules comme ERp57 et la calnexine pour participer au repliement des protéines [185]. De plus, la CRT joue un rôle important dans l'assemblage des molécules de classe I du CMH ou dans l'apprêtement des peptides antigéniques [186], en s'associant aux peptides transportés par TAP-1 et TAP-2 (*transporters associated with antigen processing*) dans le RE [187].

En réponse aux anthracyclines, à l'oxaliplatine, aux radiations ionisantes et à la thérapie photodynamique, la CRT est transloquée à la surface de la membrane plasmique, et cela précocément dans le processus apoptotique, plusieurs heures avant l'exposition de la phosphatidylsérine à la partie externe de la membrane plasmique [155] [180] [188].

L'inhibition de la capacité d'exposition de la CRT en absence d'ERp57 dans la cellule a montré la nécessité de la cotranslocation de ces deux protéines mais pas d'autres protéines du RE comme la calnexine ou le récepteur KDEL [189]. Cette cotranslocation constitue alors un signal de reconnaissance pour la phagocytose par les cellules dendritiques. Les mécanismes de translocation de la calréticuline ont pu être élucidés et sont résumés dans le schéma suivant (Fig8). Ils font intervenir la production de ROS, un module de stress du RE (induction du complexe de protéines PP1 (*protein phosphatase 1*)/GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible protein*) et des phosphorylations de PERK (*protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*) et d'eIF2 α (*Eukaryotic Initiation Factor 2*), un module apoptotique (abolition de la translocation CRT/ERp57 par l'inhibiteur à large spectre des caspases, le Z-VAD-fmk) et un module de sécrétion faisant intervenir l'appareil de Golgi et une exocytose dépendante des protéines SNARE (*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*) [190].

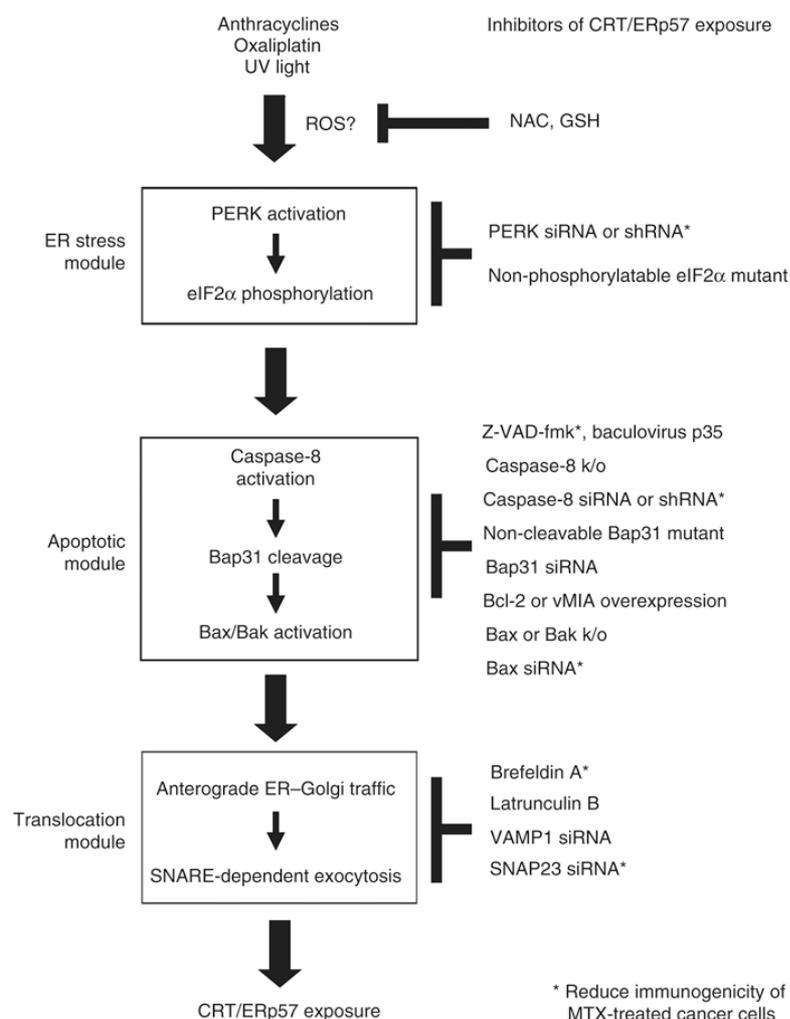


Fig 8. Schéma de la signalisation impliquée dans l'exposition à la surface cellulaire du complexe CRT/ERp57. (Panaretakis T *et al.*, EMBO J 2009)

Il est intéressant de noter que l'apoptose induite par la mitoxantrone, l'oxaplatine et les radiations UV n'est pas inhibée par des anticorps bloquant TRAIL ou des anticorps neutralisants le ligand de CD95, suggérant que les ligands des récepteurs de mort ne sont pas impliqués dans l'exposition de la CRT, et cela alors qu'il a été montré que TRAIL, FasL ou CD40L interagissaient fortement avec la CRT [191]. Henson et son équipe ont été les premiers à décrire que l'exposition de la CRT (concomitante à l'exposition de la phosphatidyl-sérine) facilitait la phagocytose des cellules mourantes par les macrophages J774 et que dans ce cas de figure, le blocage de LRP1 (*Low density lipoprotein receptor-related protein 1*)/CD91 inhibait cette phagocytose [176]. Quoiqu'il en soit, l'identité du récepteur de surface ou de l'entité biologique qui permet d'amarrer la CRT reste inconnue [192]. Néanmoins, il a été montré que l'ecto-CRT co-localisait au niveau de la membrane plasmique avec des régions riches en gangliosides GM-1 [176] et que les récepteurs de la CRT sur les DCs pouvaient être LRP1 [176], SR-A (*scavenger receptor A*) ou SREC-I (*scavenger receptor expressed by endothelial cell-I*) [193]. Plus récemment, avec la découverte de l'induction d'une apoptose immunogène par la thérapie photodynamique, un amarrage essentiel de l'ecto-CRT via la molécule LRP1 a été identifié [169]. Cependant, LRP1 est un récepteur multifonctionnel reconnaissant 30 ligands différents, cela suggère qu'il ne soit pas le seul récepteur de la CRT. De plus, il a été mis en évidence par Bajor et ses collègues en 2011 que la CRT peut exercer son pouvoir immunogène sous sa forme excrétée extracellulairement [194]. Enfin, la CRT est une protéine « collante » qui peut interagir avec des protéines solubles du sérum comme la thombospondine ou le facteur du complément C1q, lesquelles pourraient servir de pont pour faciliter la reconnaissance par les phagocytes [195].

La CRT est aussi considérée comme étant liée à la famille des protéines de choc thermique, les HSPs. Bien qu'elles n'aient pas d'homologies structurales, elles possèdent des caractéristiques communes d'induction de réponses immunitaires spécifiques, dépendantes des cellules T CD8+ [196]. Ainsi, il a été montré par Dhodapkar et son équipe que le bortezomib, un inhibiteur spécifique de la sous-unité 26S du protéasome induisait l'expression de la protéine HSP90 à la surface des cellules mourantes de myelomes humains et que la reconnaissance de ces cellules par les DCs (inhibée par la geldanamycine et sans nécessité d'adjuvant) conduisait à la production de cellules T anti-tumorales. Similairement, dans des expériences précliniques, il a été prouvé que l'augmentation de l'expression des HSPs par application d'hyperthermie locale sur les tumeurs [197] ou encore par surexpression d'HSP70 (virus oncolytiques ou plasmides codant pour HSP70) pouvait augmenter

l'immunogénicité [198]. Le ciblage extracellulaire de GRP170, une protéine chaperone du RE régulée par le glucose, peut aussi augmenter l'immunogénicité des cellules tumorales [199]. Il y a de nombreux mécanismes grâce auxquels les HSPs peuvent jouer un tel rôle, elles améliorent la reconnaissance et la phagocytose des cellules mourantes par les DCs quand elles sont présentes à la surface cellulaire, elles agissent aussi en interagissant avec les peptides antigéniques dérivés des tumeurs pour optimiser la présentation antigénique [200]. Enfin, une étude vient de démontrer que le rôle joué par les chaperokines ne se limite pas à cela car la CRT humaine extracellulaire peut aussi induire la maturation des DCs. Elle se caractérise par l'expression de plusieurs molécules de co-stimulation, comme CD86, CD40 et les molécules de classe II du CMH et par l'activation des monocytes via la signalisation NF- κ B. Enfin, le fait que la pré-activation des monocytes par les HSPs conduise à la production de presque toutes les cytokines requises pour le processus de maturation souligne bien le rôle primordial des chaperokines dans la réponse immunitaire adaptative [194] [201].

D- La sécrétion d'ATP active l'inflammasome NLRP3 et induit la polarisation des cellules T CD8+ productrices d'IFN- γ

L'oxaliplatine est efficace pour contrôler la croissance tumorale des thymomes EG7 (exprimant l'ovalbumine) ou EL4 dans les hôtes immunocompétents mais cet effet thérapeutique est anihilé dans les souris *Rag2^{-/-}* (absence de cellules T et B), dans les souris *nude* (absence de cellules T) et dans les souris déficientes pour le récepteur 1 de l'IFN- γ (*Ifngr1^{-/-}*) [202]. Cela suggère que de la même manière que pour l'élimination par immunosurveillance, la mort cellulaire immunogène implique des lymphocytes et requiert une signalisation IFN- γ /IFN- γ R intacte. En revanche, les cellules EG7, EL4, les cellules de colon CT26, ou les sarcomes MCA205 répondent parfaitement à la chimiothérapie (oxaliplatine ou doxorubicine) dans les souris déficientes pour la perforine (*Pfp^{-/-}*), TRAIL (*Tnfsf10*) ou IL-12R β 2 (*Il12rb2^{-/-}*) [203]. De plus, il a été montré que les tumeurs implantées dans des souris déficientes pour l'inflammasome NLRP3 (*NOD-like receptor pyrin domain containing-3 protein* ou cryopyrine) [204] ou la caspase-1 perdaient leur capacité de réponse à l'oxaliplatine. L'inflammasome NLRP3 est un complexe protéique multimérique qui active la caspase-1, ce qui entraîne l'activation (par clivage protéolytique) et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-18, IL-33. L'une d'entre elles, l'IL-1 β est nécessaire à la polarisation optimale des cellules T CD8+ productrices d'IFN- γ . Il a été montré que la production d'IFN- γ spécifique de l'OVA (ovalbumine) induite par les cellules EG7 mourantes

était abolit dans les souris *Nlrp3^{-/-}*, *Casp1^{-/-}* et les souris déficientes pour le récepteur de l'IL-1 β , ce qui suggère qu'un inflammasome NLRP3 fonctionnel est nécessaire à l'activation des lymphocytes T naifs [203]. Or, un des activateurs les plus pléiotropiques de l'inflammasome NLRP3 est l'ATP extracellulaire relargué par les cellules stressées et qui agit sur les récepteurs purinergiques [205]. En effet, la déplétion en ATP par le DNP (2,4-dinitrophenol) ou l'addition d'apyrase (enzyme dégradant l'ATP) abolit la capacité d'induction d'une réponse immunitaire locale des cellules EG7 mourantes, suggérant que le rechargement d'ATP joue un rôle primordial dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 pour induire une mort cellulaire immunogène [202]. En outre, l'équipe du Dr Rachivandran en 2009, a mis en évidence que l'élimination enzymatique de l'ATP et de l'UTP inhibait la capacité des surnageants des cellules apoptotiques à recruter des monocytes *in vitro* et *in vivo* et il a été identifié que le récepteur purinergique P2Y₂ était un capteur essentiel de ces nucléotides [206] [207]. De plus, l'inhibition de la sous-classe de récepteurs purinergiques P2X par le PPADS (iso pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',5'-disulphonate) abolit la stimulation des cellules T par les DCs exposés aux cellules EG7 traitées par l'oxaliplatine. Enfin, le récepteur P2X₇ possédant une forte affinité pour l'ATP, la capacité des souris *p2rx7^{-/-}* à entraîner une réponse à l'IFN- γ conduisant à la polarisation des cellules T CD8⁺ a été évaluée et a ainsi révélé que l'interaction ATP/P2RX₇ était indispensable à l'induction d'une mort cellulaire immunogène [202]. Le récepteur P2X₇ est un récepteur ionotropique à distribution ubiquitaire, fortement exprimé sur les cellules immunitaires. L'activation du récepteur P2X₇ par l'ATP extracellulaire induit le recrutement à la membrane de pannexin-1 ce qui entraîne l'ouverture d'un canal cationique permettant la sortie massive d'ions K⁺. Il a été mis en évidence qu'un inhibiteur des canaux K⁺ sensible à l'ATP (le glyburide) pouvait bloquer l'activation de l'inflammasome NLRP3 par l'ATP [208].

Enfin, dans un contexte plus clinique, il a été montré qu'il existait des mutations gain de fonction du gène *NLRP3*, entraînant une maladie inflammatoire, le syndrome de Muckle-Wells, pouvant être traitée par administration systémique d'antagonistes du récepteur de l'IL-1 β [209]. De plus, un polymorphisme du gène *P2RX7* humain (Glu496Ala) a été associé à un déficit de liaison à l'ATP [210], et à une diminution de la sécrétion d'IL-1 β [211] par les monocytes humains, dont la fréquence dans la population caucasienne est de l'ordre de 30%. Enfin, la survie sans progression de patientes porteuses de cancer du sein non métastatiques et traitées par des anthracyclines, a été étudiée en fonction de leur génotype pour *P2RX7* (variant vs normal). L'analyse par un modèle de régression de Cox a mis en évidence une association

statistiquement significative entre le génotype *P2RX7* et la survenue de métastases (Hasard ratio* de 1.6 IC95 1.074; 2,398) (Fig9). Ces résultats démontrent l'implication du récepteur *P2X7* dans la voie de l'inflammasome activée par la mort cellulaire tumorale et confirme l'implication du système immunitaire dans la réponse thérapeutique aux anthracyclines chez l'Homme [202].

*Désigne le rapport des taux d'incidence dans un modèle de COX (la survenue de métastases est donc 1,6 fois supérieure dans le groupe *P2RX7* variant). IC : Intervalle de Confiance

Supplemental Table 1. Baseline characteristics of the individuals, tumors, and primary treatments			
	<i>P2X7 (Glu496Glu)</i> (n=144)	<i>P2X7 (Glu496Ala)</i> (n=81)	p values
Mean Age (years)	48.7±10.7	49.6.6±11.5	NS
Pathological Nodal status – n (%)			
1 – 3 positive nodes (pN1)	87 (60.4)	45 (54.3)	NS
4-9 positive nodes (pN2)	45 (31.2)	25 (30.9)	
≥10 positive nodes (pN3)	12 (8.4)	12 (14.8)	
Pathological Tumor size – n (%)			
0-2 cm (pT1)	38 (26.6)	28 (34.6)	NS
2-5 cm (pT2)	89 (62.2)	47 (58)	
>5cm (pT3, pT4)	16 (11.2)	6 (7.4)	
Mean pathological tumor size (cm)	2.75±1.9	2.45±1.7	NS
Histologic grade of tumor – n (%)			
3 Poorly differentiated	60 (43.2*)	29 (38.7)	NS
2 Moderately differentiated	66 (47.5)	39 (45.2)	
1 Well differentiated	13 (9.3)	7 (9.3)	
Hormone receptor status – n (%)			
positive	36 (24.8)	24 (28.2)	NS
negative	104 (71.7)	55 (64.8)	
Missing	5 (3.5)	6 (7)	
Follow up (months) M ± SD	71.5±40.6	77.5±41.6	NS

pT: pathological tumor size. pN: pathological Nodal involvement. All data are presented as means ± standard deviation, or percentages.

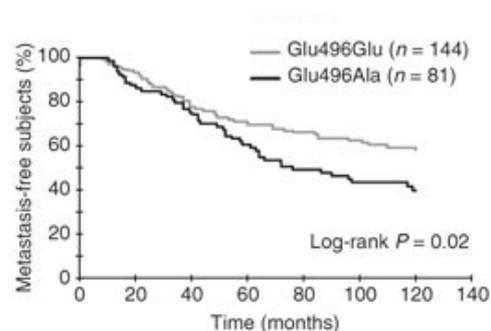


Fig 9. Tableau récapitulatif et courbes de Kaplan Meier estimant la rechute métastatique dans une cohorte de patientes atteintes de cancer du sein ($n = 225$), traitées aux anthracyclines et porteuses des allèles normaux de *P2RX7* (Glu496Glu) ou de la mutation perte de fonction (Glu496Ala). (Ghiringhelli F *et al.*, Nat Med 2009)

Néanmoins, bien que les voies de signalisation qui régissent l'exposition de la CRT à la surface membranaire aient été définies dans une certaine mesure, les informations concernant la signalisation moléculaire impliquée dans la sécrétion d'ATP restent insuffisantes même s'il a été noté qu'en réponse aux inducteurs de la MCI, les cellules cancéreuses manifestaient deux types de réponses de stress *premortem*, le stress du RE mais aussi l'autophagie. L'autophagie est un processus conservé au cours duquel les membranes subcellulaires subissent des changements morphologiques dynamiques (autophagosomes) qui conduisent à la dégradation des protéines cellulaires et des organites cytoplasmiques [212] [213] [214]. De récentes démonstrations ont révélé que la voie de signalisation phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)–AKT–mTOR, activée dans plusieurs types de cancer [215], est importante pour

l'autophagie [216] et joue un rôle complexe dans le développement tumoral. A un stade précoce de la carcinogénèse, l'inhibition de l'autophagie peut conférer un avantage à la croissance tumorale, celle-ci nécessitant un niveau plus élevé de synthèse protéique que de dégradation [217]. Le complexe formé par la PI3K de classe III et beclin 1 (BECN1/Atg6) au niveau du réseau trans-golgien est un activateur de l'autophagie [218]. Et des niveaux diminués de BECN1 ont été retrouvés dans les échantillons tumoraux de patientes atteintes de cancer du sein. De plus, les lignées cellulaires de cancer du sein contiennent fréquemment des délétions dans un des allèles du gène codant pour BECN1 [219]. Enfin, la contribution de la délétion allélique de *BECN1* à la carcinogénèse a été également démontrée par une incidence accrue de cancers du poumon, de carcinomes hépatocellulaires et de lymphomes dans des souris *BECN1*^{+/-} [220] [221]. Toutefois, à des stades tardifs de la progression tumorale, l'autophagie semble agir comme un mécanisme de protection contre les conditions de stress, permettant aux cellules des zones centrales de la tumeur de proliférer en maintenant leur anabolisme lors de conditions faibles en nutriment et en oxygène [217, 222].

Plusieurs protéines Atg sont impliquées dans la formation de l'autophagosome. L'ubiquitination d'Atg5 et Atg12 par les enzymes Atg7 et Atg10 est nécessaire au recrutement des autres protéines à la membrane autophagosomale pour former la vacuole autophagique [223, 224]. Et, il a été observé que l'extinction des gènes *ATG3*, *ATG5*, *ATG7* et *BECN1* abolissait la sécrétion pré-apoptotique d'ATP dans plusieurs lignées cellulaires humaines et murines, succombant à la MCI. En revanche, l'autophagie n'a aucun impact sur l'exposition membranaire de la CRT ou sur le relargage d'HMGB1 et son induction par des stimuli pharmacologiques comme la rapamycine n'est pas suffisante pour entraîner un relargage d'ATP. Il a été montré que la sécrétion d'ATP autophagie dépendante n'a lieu que dans un contexte de mort cellulaire imminente, c'est à dire lorsque les caspases sont activées, peu de temps avant l'exposition de la phosphatidyl-sérine et la rupture de la membrane plasmique [225] [226]. Cela suggère que l'activation de l'autophagie *premortem* permettrait de préserver un statut bioénergétique, dans lequel en dépit des dommages cellulaires consommateurs d'énergie, les tentatives de réparations et les niveaux intracellulaires d'ATP seraient maintenus. Plusieurs arguments démontrent que la sécrétion d'ATP induite par les chimiothérapies immunogènes est dépendante d'une signalisation autophagique. Ainsi, toutes les expériences tendant à réduire le flux autophagique, que ce soit par l'extinction des gènes *ATG3*, *ATG5*, *ATG7*, *ATG10* et *BECN1* ou par l'ajout de chloroquine (alkalinisation des lysosomes), de bafilomycine A1 (inhibiteur spécifique de l'ATPase responsable de la maturation des vacuoles autophagiques) atténuent la capacité des

cellules tumorales mourantes à vacciner les souris contre une ré-injection de cellules vivantes de même type. De plus, la co-injection d'inhibiteurs des ATPases extracellulaires comme l'ARL67156 ou le NGXT191 restaure l'immunogénicité des cellules mourantes déficientes pour l'induction d'autophagie. Enfin, dans des tumeurs autophagie-compétentes, un important infiltrat monocytaire et lymphocytaire (DCs et lymphocytes T activés) a été retrouvé à deux jours et neuf jours après l'administration systémique d'inducteurs de la MCI [226]. Reste à savoir désormais si de tels mécanismes peuvent être impliqués dans l'échappement à l'immunosurveillance pendant l'oncogénèse précoce des cellules pré-malignes autophagie-déficientes.

Les cellules tumorales libérant de l'ATP après traitement par des anthracyclines amorcent donc une réponse bénéfique de type 1 (Th1/Tc1) dépendante de la sécrétion d'IL-1 β et certains composants inflammatoires, à l'interface des réponses immunitaires innées et adaptatives ont été récemment identifiés. Ainsi, peu de temps après la chimiothérapie, des sous-populations distinctes de lymphocytes T $\gamma\delta$ (V γ 4⁺ et V γ 6⁺) producteurs d'IL-17A et de TIL CD8⁺ colonisent la tumeur. La spécificité d'action de ces cellules a été mise en évidence par l'inhibition des voies de signalisation de l'INF- γ ou de l'IL-17A qui abolit l'effet thérapeutique de la doxorubicine et de l'oxaliplatine. Bien que les cellules T $\gamma\delta$ produisent à la fois de l'IL-17A et de l'IL-22, seule l'absence d'une signalisation fonctionnelle IL-17A–IL-17R inhibe les réponses des cellules T spécifiques des tumeurs [227]. Ces résultats suggèrent l'existence d'un axe fonctionnel impliquant la production d'IL-1 β par les cellules dendritiques, stimulant ainsi la production d'IL17 et les fonctions anticancéreuses des cellules T $\gamma\delta$, celles-ci attirant les effecteurs Tc1 au site tumoral [149, 228].

E- Le relargage d'un facteur pro-immunogène HMGB1, indispensable à une présentation antigénique optimale

Parce que l'activation d'une immunité innée est un pré-requis au déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative, il est primordial de s'intéresser aux mécanismes des effecteurs du système inné pouvant intervenir dans l'activation des cellules T au cours de la chimio- ou radiothérapie. Les TLRs (*Toll-Like Receptor*) font partie des effecteurs essentiels de l'immunité innée, exprimés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes et hautement conservés, ils reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) [229]. Ils sont en outre, capables de détecter des signaux de danger d'origine endogène (DAMPs) qui peuvent être émis par des cellules stressées ou endommagées, pour

moduler des réponses immunitaires adaptatives [230] [231]. De manière à évaluer l'implication des TLRs dans le contrôle d'une réponse immunitaire contre les cellules tumorales mourantes, l'effet de la doxorubicine, de l'irradiation ou de l'oxaliplatine a été comparativement suivi dans différents modèles de tumeurs établies, à savoir les cellules CT26 (carcinomes du colon), les TS/A (adénocarcinomes mammaires) ou les GOS (ostéosarcomes de Glasgow) dans les souris sauvages (WT) et les souris déficientes pour *Tlr4*. Contrairement à l'inhibition de la croissance tumorale observée dans les hôtes sauvages, aucun effet significatif ne fut mis en évidence dans les souris *tlr4*^{-/-}, ce qui souligne le rôle essentiel de TLR4 dans le contrôle du développement tumoral [232]. La présence des cellules T est également nécessaire à l'induction d'effets anti-tumoraux puisqu'aucune réponse anti-tumorale efficace n'a été observée dans les souris *nude* après traitement systémique des tumeurs TS/A ou GOS. Après avoir interagit avec son ligand, TLR4 peut alors transduire une signalisation via deux protéines adaptatrices, TRIF (*Toll/IL-1R domain containing adaptor inducing IFN β*) ou Myd88 (*myeloid differentiation primary response protein*) [233]. Aini, pour identifier la signalisation impliquée dans l'efficacité de l'oxaliplatine, la croissance des tumeurs GOS dans les souris sauvages, *Trif*^{-/-} et *MyD88*^{-/-} a été comparée. Ces expériences ont révélé le caractère essentiel de la signalisation TLR4/MyD88 dans la contribution au succès de la thérapie anti-cancéreuse. Ensuite, pour élucider les mécanismes moléculaires sous-tendant l'immunogénicité des traitements *in vivo*, les différents TLRs ont été criblés pour leur capacité à induire une présentation antigénique par les DCs aux cellules T naives (mesure de la production d'IFN- γ par les cellules des ganglions lymphatiques drainant, après re-stimulation par la protéine OVA). Ainsi, les cellules EG7 mourantes (EL4 exprimant la protéine OVA) ont été injectées dans des souris WT ou *Tlr1*^{-/-}, *Tlr2*^{-/-}, *Tlr3*^{-/-}, *Tlr4*^{-/-}, *Tlr5*^{-/-}, *Tlr6*^{-/-}, *Tlr7*^{-/-}, *Tlr9*^{-/-} et seules les souris déficientes pour *TLR4* n'ont pu induire une présentation antigénique optimale. Ainsi, il a été montré que TLR4 était impliqué dans la présentation croisée des antigènes membranaires aux lymphocytes T CD4 et T CD8 mais à l'inverse, TLR4 n'est pas impliqué dans la présentation des antigènes solubles [182] [233]. De plus, il a été noté que dans les DCs *Tlr4*^{-/-}, les particules phagocytaires des cellules EG7 étaient plus rapidement détruites par la voie lysosomale que dans les DCs WT. Cette observation en accord avec une étude précédente qui reportait que TLR4 prévenait la fusion des endosomes et des lysosomes [234]. Ainsi, des inhibiteurs de la maturation des vacuoles comme la chloroquine ou la bafilomycine A1 peuvent compenser l'absence de réponse à la chimiothérapie dans les souris *Tlr4*^{-/-} [232]. L'absence du TLR4 entraîne donc une fusion

accélérée des endosomes avec les lysosomes, ce qui conduit à la destruction des antigènes tumoraux qui ne peuvent alors être présentés à la surface des DCs.

Contrairement à la plupart des TLRs qui interagissent avec un panel restreint de ligands, TLR2 et TLR4 peuvent cibler une large variété de DAMPs [231]. En effet, de nombreuses protéines endogènes se lient et peuvent stimuler TLR4, c'est le cas notamment des protéines HSP60 et HSP70, des LDL oxydées [235], de la fibronectine et de la β -défensine [236] ou encore d'HMGB1 (*alarmin high-mobility group box 1 protein*) [237]. Le terme « alarmin » regroupe un ensemble de protéines rapidement relarguées au cours d'une infection ou lors de lésions tissulaires qui mobilise et active les effecteurs des systèmes de défense et de réparation de l'hôte [238]. HMGB1 (aussi appelée amphotérine) est une abondante protéine nucléaire liée à la chromatine et non aux protéines histones, elle intervient dans plusieurs fonctions comme la transcription ou l'assemblage de complexes nucléoprotéiques [172]. Il existe trois types de protéines HMGB, composées de deux domaines de liaisons à l'ADN (boîtes A et B) et d'une queue C-terminale [239]. HMGB1 a une expression ubiquitaire alors qu'HMGB2 et HMGB3 sont exprimées principalement au cours de l'embryogénèse [240]. HMGB1 peut être sécrété directement par les macrophages et les monocytes activés (IL-1 β , TNF ou LPS) mais cette sécrétion active requiert l'acétylation de plusieurs résidus lysine spécifiques [239]. HMGB1 a aussi été longtemps perçu comme un DAMPs, relargué passivement par les cellules nécrotiques [241]. Il est néanmoins devenu de plus en plus évident que d'autres voies de mort cellulaire, comme l'apoptose [242] ou la mort cellulaire « autophagique » [243] pouvaient entraîner un relargage d'HMGB1 à certains stades de la phase exécutive. En effet, il a été reporté qu'HMGB1 était associé à l'apoptose, notamment lors de la phase de nécrose secondaire, ce processus de relargage étant bloqué par le z-VAD-fmk [232] [242] (inhibiteur des caspases et retardateur de la nécrose secondaire) [244]. En outre, HMGB1 est détectable dans le surnageant des cellules (CT26, MCA205, EG7, ou TS/A) en nécrose secondaire, 18h après traitement par des anthracyclines (ou autres inducteurs de la MCI). Des expériences d'immunoprécipitations ont confirmé que TLR4 à la surface des macrophages interagissait directement avec la protéine HMGB1, provenant des surnageants de cellules CT26 traitées à la doxorubicine. Ensuite, il a été montré que la neutralisation de tous les ligands possibles de TLR4 par la protéine de fusion TLR4-Fc inhibait la présentation de l'OVA (provenant des cellules EG7 irradiées) médiée par les DCs, et cela de la même manière que la neutralisation d'HMGB1 par un anticorps. Ainsi, HMGB1 libéré par les cellules tumorales mourantes, en se liant à TLR4, facilite la présentation croisée

des antigènes tumoraux par les DCs en diminuant la dégradation lysosomale du matériel phagocyté [172] mais peut aussi réguler négativement la fonction immunosuppressive des T_{regs} [245]. Du reste, la forme extracellulaire d'HMGB1 présente d'autres actions immunostimulatrices, elle active les macrophages [246], les DCs immatures dérivant des monocytes [238] et induit le recrutement des neutrophiles [247]. Enfin, l'invalidation de l'expression d'HMGB1 par siRNA dans les cellules tumorales diminue leur immunogénicité *in vivo*, les rendant incapables de médier une vaccination anti-cancéreuse après traitement aux anthracyclines ou à l'oxaliplatine. [232] Toutefois, ces rôles immunostimulateurs d'HMGB1 peuvent être modifiés au niveau post-transcriptionnel, notamment par la production de ROS pouvant oxyder HMGB1 et induire une immuno-tolérance [248]. Cependant, il a été démontré que la forme oxydée d'HMGB1 augmentait la cytotoxicité des agents chimiothérapeutiques et des radiations ionisantes et cela, par l'induction d'une apoptose des cellules cancéreuses impliquant la voie mitochondriale [249].

Chez l'Homme, il a été découvert deux polymorphismes du gène *TLR4*, les SNPs (*Simple Nucleotide Polymorphism*) rs4986790 et rs4986791, qui correspondent respectivement aux substitutions Asp299Gly et Thr399Ile, affectant le domaine extracellulaire de TLR4. Il a d'abord été démontré que ces mutations étaient associés à une hyposensibilité au LPS inhalé, mise en évidence par la perte de capacité de production d'IL-1 α par les cellules épithéliales alvéolaires [250]. Ensuite, en transfectant des cellules Hela avec l'ADNc codant pour l'allèle Asp299Gly de TLR4, il a été montré par coimmunoprécipitation que ces mutations inhibaient l'interaction entre TLR4 et la protéine HMGB1 recombinante. De plus, bien que les DCs dérivant des monocytes de personnes non atteintes puissent présenter les antigènes des cellules de mélanomes mourantes aux lymphocytes T cytotoxiques (de manière dépendante d'HMGB1), les DCs dérivant des monocytes d'individus porteurs de la mutation Asp299Gly ne parviennent pas à le faire [232]. Ces résultats conduisent alors à examiner la pertinence clinique de la mutation de TLR4 dans la réponse au traitement anticancéreux. Ainsi, une étude rétrospective à partir d'une cohorte de 280 patients présentant des cancers du sein avec envahissement des ganglions lymphatiques et traitées par radiothérapie et chimiothérapie adjuvante à base d'anthracyclines (protocole FEC), a été réalisée. Après génotypage de l'ADN sanguin par PCR taqman, la fréquence d'expression monoallélique du polymorphisme Asp299Gly a été évalué à 17.1%. Aucune différence significative n'a été observée concernant les facteurs pronostiques classiques (âge, taille des tumeurs, grade, récepteurs hormonaux) entre les patients contrôles

et les individus porteurs de la mutation de l'allèle de *Tlr4*. Cependant, la survie sans métastase des femmes porteuses du variant allélique de *Tlr4* fût significativement plus faible (50% de rechute pour les porteuses de la mutations, 37.4% chez les patients non mutés, à 10 ans ; Log-rank test, $P = 0.03$) [251] [232]. Au final, la mutation *Tlr4* a été identifiée comme un facteur prédictif indépendant, du succès thérapeutique d'un traitement adjuvant à base d'anthracyclines. De plus, l'impact de la perte de fonction de l'allèle de *TLR4* sur la survie sans progression métastatique (progression free survival PFS) a ensuite été étudié chez 338 patients atteints de cancers colorectaux (CRC) et traités à l'oxaliplatine. Il a été observé que les patients porteurs de l'allèle normal de *Tlr4* présentaient une survie sans progression (Hasard ratio de 0.73, IC95% 0.53; 1.00) et une survie globale (Hasard ratio de 0.72, IC95% 0.52; 1.01) améliorées par rapport à celle des patients porteurs de la mutation perte de fonction. En revanche, dans une cohorte de patients atteints d'un CRC au stade II (n=258), traités par résection chirurgicale et sans chimiothérapie adjuvante, aucune différence statistique n'a été observée. Ces résultats suggèrent que la substitution Asp299Gly du gène *TLR4* n'est pas un facteur pronostique mais plutôt un facteur prédictif de la réponse à l'oxaliplatine [151] [252].

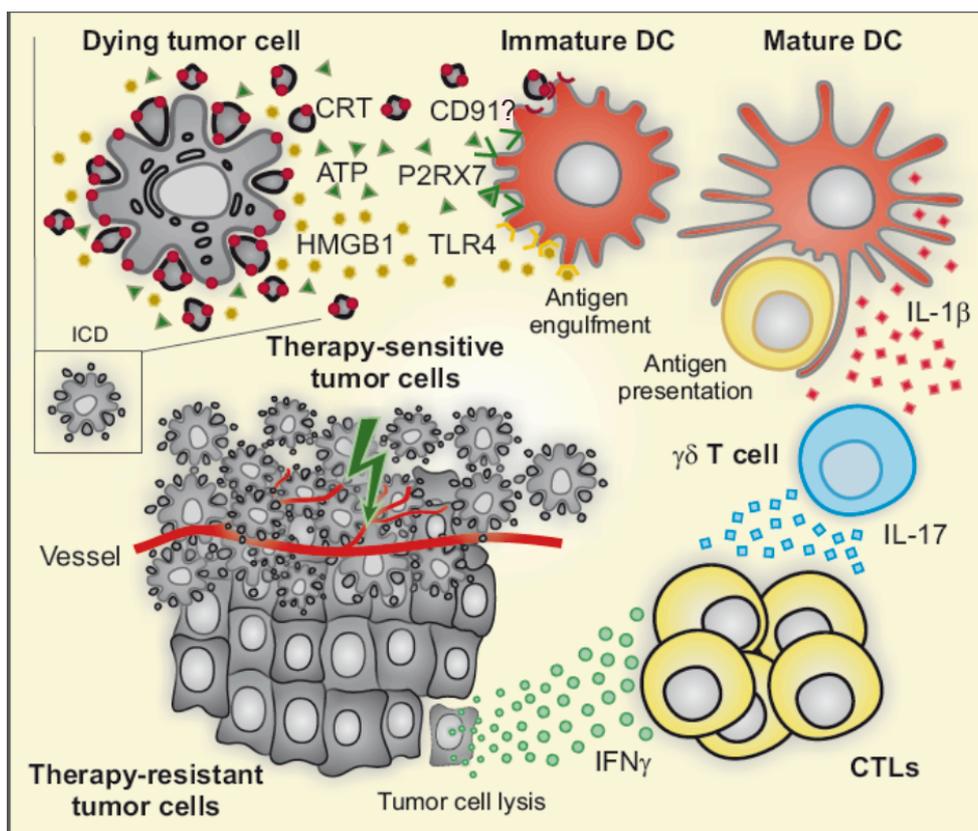


Fig 10. Schéma récapitulatif des particularités de la mort cellulaire immunogène (adapté de Galluzzi L et al, 2012 *In press*) L'exposition de la calréticuline pré-apoptotique, la sécrétion apoptotique d'ATP et la libération d'HMGB1 post-apoptotique sont nécessaires aux cellules mourantes pour induire une maturation des DCs productrices d'IL-1β pouvant recruter les cellules Tγδ et polariser les CTLs vers la production d'IFN-γ, essentielle à l'efficacité antitumorale de la réponse immunitaire.

E- Stratégie d'identification de nouveaux inducteurs de la MCI

Grâce aux récents progrès dans le domaine de la chimie combinatoire de nouveaux outils et notamment des bibliothèques de molécules sont devenus disponibles et permettent ainsi l'utilisation des approches de criblages à haut débit [253]. Le but de l'étude a donc été d'identifier de nouveaux inducteurs d'une MCI, à partir d'une bibliothèque de composés approuvés par la FDA (*Food and Drug Administration*) et donc couramment utilisés en clinique. Un des intérêts principaux de cette stratégie est la connaissance de la pharmacodynamique des composés utilisés, qui fournit un avantage considérable pour l'utilisation immédiate des molécules en essai clinique. Cette approche est rendue possible par l'identification des mécanismes moléculaires indispensables à la MCI et les avancées technologiques de ces dix dernières années dans les domaines de la robotisation des

microscopes et des outils d'analyse d'images automatisés [254]. Ainsi, nous avons utilisé la plateforme de microscopie à fluorescence automatisée BD pathway 855® pour suivre l'apparition séquentielle des trois événements majeurs de la MCI, c'est à dire la co-translocation de la CRT et de la protéine chaperone ERp57 à la surface cellulaire [155] [189], la sécrétion d'ATP dépendante de l'autophagie [202] [225] et la libération plus tardive d'HMGB1 [232]. Pour cela, nous avons construits des biosenseurs ou lignées exprimant stablement les protéines de la MCI, à savoir la CRT, la LC3 et HMGB1 fusionnées à la GFP (*Green Fluorescent Protein*) et une protéine histone H2B fusionnée à la RFP (*Red Fluorescent Protein*). L'utilisation d'une protéine nucléaire fluorescente comme H2B (ou d'autres marqueurs : Hoechst 33342 ou DAPI) permet d'évaluer la viabilité cellulaire par la quantification du nombre de noyaux. Cependant, cette technique présente les mêmes problèmes que les autres tests de viabilité, à savoir l'incapacité de distinction entre mort cellulaire et arrêt de la prolifération même si elle renseigne sur la morphologie nucléaire. C'est pour cela qu'un marqueur de la perméabilisation cellulaire (iodure de propidium) a été également ajouté dans les criblages suivants.

La redistribution des protéines de fusion CRT-GFP et ERp57-GFP du réticulum endoplasmique à la périphérie cytoplasmique (granularité) est un événement morphologique substitutif et préalable à l'exposition membranaire de ces protéines. La relocalisation à la surface membranaire a été confirmée par le marquage de la protéine de fusion CRT-HaloTag avec le ligand HaloTag imperméable. La sécrétion d'ATP a été conjointement évaluée par la disparition du marquage quinacrine de l'ATP vésiculaire et d'un signal fluorescent basé sur le transfert d'énergie par résonance (FRET) entre les protéines fluorescentes de la sous-unité ϵ de la synthase F1F0-ATP synthase. L'autophagie a été mise en évidence par l'agrégation punctiforme de la protéine de fusion GFP-LC3 dans le cytoplasme (autophagosomes ou autophagolysosomes). Enfin, la redistribution de la protéine de fusion HMGB1-GFP du noyau au milieu extracellulaire a été estimée en parallèle de la perméabilisation membranaire.

MATERIEL ET METHODES

Lignées cellulaires tumorales. Toutes les lignées cellulaires ont été maintenues à 37 ° C sous 5% de CO₂. Tous les milieux ont été complétés avec 10% (v / v) de sérum bovin foetal (FBS), 1 mM pyruvate de sodium, 10 mM d'HEPES, 10 U/mL de sodium, de pénicilline et 10 pg/mL de sulfate de streptomycine. Les cellules murines de fibrosarcome MCA205, les cellules humaines de cancer de la prostate LNCaP, de carcinome oral Cal27 et de carcinome hépatocellulaire HepG2 ont été cultivées dans du RPMI-1640; les cellules d'ostéosarcomes U2OS, les cellules du col de l'utérus HeLa et les adénocarcinomes du sein MDA-MB 231 ont été cultivés dans du DMEM; les adénocarcinomes du côlon HCT 116 ont été maintenus dans un milieu 5A de McCoy et les carcinomes pulmonaires non à petites cellules A549 dans du F-12K. Les cellules U2OS co-exprimant de manière stable les protéines de fusion fluorescentes histone 2B-RFP (H2B-DP) et calréticuline-GFP (CRT-GFP), HMGB1-GFP ou GFP-LC3 ont été cultivées en présence continue de 200 pg/mL de G418 + 1 pg/mL de blasticidine ou 200 µg/mL de zeocine + 1 pg/mL blasticidine. Les cellules exprimant de façon stable U2OS CRT-HaloTag[®] (CRT-HT), Ateam, ou ERp57 fusionnée à la GFP (ERp57-GFP) ont été maintenues en présence de 200 µg/mL de zeocine ou 200 pg/mL de G418.

Transfections plasmidiques stables et transitoires. Les cellules U2OS ont été transfectées en utilisant le réactif de transfection Lipofectamine2000[®] (Invitrogen) avec soit l'ADNc codant pour la CRT-GFP, ERp57-GFP, GFP-LC3, Ateam ou HMGB1-GFP. Les cellules transfectées ont été sélectionnées en présence d'antibiotiques et clonées par tri au cytomètre en flux (Becton Dickinson, San José, USA). Pour l'expression d'H2B-RFP, les clones ont été transduits par des particules lentivirales grâce à un système d'expression lentivirale ViraPower[™] (Invitrogen). L'ADNc codant l'H2B-RFP a été clone dans le plasmide pENTR/D-TOPO plasmid (Invitrogen), en utilisant les amorces: 5'-CACCATGCCAGAGCCAGCGAAG-3' et 5'-TTAGGCGCCGGTGGAGTGGC-3'. La séquence codante pour H2B-RFP a été ensuite recombinaisonnée dans le vecteur d'expression lentiviral pLenti6/V5-DEST (Invitrogen), suivant les recommandations commerciales. La production de particules virales s'est faite par transfection transitoire de cellules de rein humaines 293HT. Le virus a été ensuite concentré par ultracentrifugation et titré avant l'infection. Pour l'expression des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 3$ des Na⁺K⁺ATPases humaines et murines, des cellules U2OS ont été co-transfectées par les constructions codant pour les gènes humains *Atpla1* et *Atpla3*, murins *Atpla1*- ou *Atpla3* (envoyées par T. Maniatis, Harvard University) et le plasmide codant pour DsRed (pDsRed, Clontech-Invitrogen, USA). Les cellules ont été ensuite sélectionnées pour la résistance au G418, conférée par ce plasmide.

Criblage à haut débit de l'exposition membranaire de la CRT, d'ERp57, du relargage d'HMGB1 et d'ATP, de la granularité de la GFP-LC3. Cinq x 10³ cellules U2OS co-exprimant de manière stable H2B-RFP, CRT-GFP ou ERp57-GFP ou HMGB1-GFP ou GFP-LC3 ont été ensemencées dans des plaques 96 puits poly-L-lysine-prétraité Black/Clear et incubées 24 h. Les composés de la bibliothèque *oncology drug set* (NCI DTP) ont été ajoutés à des concentrations finales de 1 et 10 µM, alors que les agents de la bibliothèque *US Drugs collection* (Microsource Discovery Systems, USA) ont été utilisés à la concentration de 1 µM. Les cellules ont été incubées 4h, 12h ou 24h et fixées avec du paraformaldehyde à 4% pendant 20 min. Le paraformaldehyde a été remplacé par du PBS et quatre images de chaque puits ont été acquises grâce au microscope à fluorescence automatisés BD Pathway 855 automated bioimager (BD Biosciences), équipé d'un objectif UApo/340 x 20/0.75 (Olympus, Japan). Les images ont ensuite été segmentées et analysées à l'aide du logiciel BD AttoVision software version 1.6.1 (BD Biosciences). Les composés relargant l'ATP ont été identifiés grâce à l'utilisation de cellules exprimant stablement le biosenseur FRET d'ATP FRET-based ATP Ateam, ou par marquage quinacrine, (1 µM de quinacrine dans une solution de Krebs-Ringer (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 0.7 mM KH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 6 mM glucose and 25 mM HEPES, pH 7.4) pendant 30 min à 37 °C). En parallèle de l'évaluation des statuts de la CRT, d'HMGB1 et d'ATP, la morphologie nucléaire a été déterminée et utilisée comme indicateur de la mort cellulaire. Pour prendre en considération les variations intra et inter-plaque, les données intra-plaque ont été normalisées en évaluant le ratio par rapport à la moyenne de chaque point d'une plaque, les données inter-plaque ont été normalisées en utilisant le Z-scores.

Transcription inverse des siRNA. Les plaques 384 puits Bio-One µClear (Greiner Bio One, Autriche) ont été recouvertes de siRNA distincts à 250 nM (Qiagen), conçus pour cibler 250 gènes humains différents impliqués dans les signalisations la mort cellulaire et de la réponse au stress. Les siARN ont été positionnés de manière aléatoire afin de minimiser les effets spatiaux. Pour chaque gène, deux siRNA distincts ont été choisis, après impression, les plaques ont été déshydratées, scellées et conservées à -20 ° C jusqu'à leur utilisation. Pour la transfection inverse, les siRNA ont été réhydratés avec 5 µL de milieu OptiMEM (Invitrogen), suivie par l'addition du réactif de transfection ® HiPerfect (Qiagen) selon les instructions du fabricant.

Détermination des concentrations d'HMGB1 et d'ATP. La quantification d'HMGB1 dans les surnageants cellulaires a été réalisée par une méthode immuno-enzymatique (HMGB1 ELISA kit II, Shino test corporation, Japan) selon les instructions commerciales. Les concentrations d'ATP extracellulaires ont été déterminées grâce à un test ENLITEN ATP (Promega, Madison, USA), basée sur un système luciférine–luciférase, suivant les instructions. L'absorbance et la chimioluminescence ont été mesurées au moyen d'un lecteur Fluostar OPTIMA (BMG Labtech, Germany).

Quantification de l'adhérence cellulaire en temps réel. 5×10^3 cellules U2OS ont été transfectées avec les constructions codant pour les pompes murines *Atp1a1*, *Atp1a3*. Vingt quatre heures après, les cellules ont été transférées dans des plaques 96 puits E-plates (Roche, Mannheim, Germany) pendant 24 h avant d'être traitées par 0.1, 1 ou 10 μ M de digoxine pour 48 h supplémentaires. Leur adhérence à la surface recouverte de microélectrodes d'or a été contrôlée toutes les 15 min en fonction de l'impédance électrique cellulaire, au moyen d'un analyseur portable xCELLigence Real-Time (Roche). L'impédance électrique cellulaire mesure l'opposition d'un tapis de cellules adhérentes au passage d'un courant alternatif.

Immunofluorescence. Pour le marquage membranaire de la calréticuline et des protéines HSP90, après traitement, les cellules ont été récupérées, lavées au PBS et fixées avec du paraformaldehyde à 0.25%. Après lavage avec du PBS à 4°C, les cellules ont été incubées 30 min sur glace avec les anticorps anti-CRT (ab2907, Abcam, Cambridge, UK) ou anti-HSP90 antibody (ab13495, Abcam) dilués dans du tampon de blocage froid (3% SVF, v:v dans PBS), suivi d'un lavage et d'une incubation de 30 min avec l'anticorps secondaire approprié conjugué à l'AlexaFluor 488[®] (Invitrogen). L'iodure de propidium a été ajouté à la concentration de 1 μ g/mL, après un dernier lavage. L'anticorps Isotype anti-IgG (Cell Signaling Technology, USA) a été utilisé comme contrôle négatif du marquage. Pour le marquage de la CRT-HaloTag[®], les cellules U2OS exprimant la protéine de fusion CRT-HaloTag[®], générées comme décrit précédemment (1) ont été incubées 30 min avec le ligand imperméable HaloTag AlexaFluor 488[®] dilué dans du milieu DMEM complet. Après lavage, les cellules ont été marquées avec 1 μ g/mL de iodure de propidium (PI), suivi d'une analyse en cytofluorométrie, limitée aux cellules vivantes (PI⁻). Pour les marquages des protéines eIF2 α , ATF6 et XBP1, les cellules U2OS ont été cultivées sur des lamelles et traitées avec de la MTX, des glucosides cardiotoniques ou de la thapsigargine, ont été lavées avec du PBS et fixées avec de la PFA à 4% pendant 10 min, perméabilisées avec 0,1% de Triton-X100

pendant 10 min puis rincées avec du PBS. Les sites de liaison non spécifiques ont été bloqués avec 10% de sérum de chèvre dans du PBS pendant 30 min. Les cellules ont ensuite été incubées une nuit à 4 ° C avec des anticorps primaires reconnaissant la protéine phosphorylée eIF2 α (P-eIF2 α , # 3597, Cell Technology de signalisation) ATF6 (ab37149) ou XBP1 (37152), dilué dans du PBS additionné de sérum de chèvre 3% (v: v). Après lavage, les lamelles ont été incubées avec l'anticorps secondaire AlexaFluor ® conjugué (Molecular Probes) approprié, en présence de 1 pg/mL de Hoechst 33342, et enfin montées sur des lames avec le milieu de montage Fluoromount ®.

Vaccination antitumorale et traitement de tumeurs établies. Les cellules de fibrosarcomes murines MCA205 (H-2^b) ont été incubées avec 1 μ M de MTX, 20 μ M de digoxine ou 40 μ M de digitoxine en présence ou non de 200 μ M de MitoC ou de 150 μ M de CDDP pendant 24 h pour obtenir une mortalité d'environ 60% (marquage Annexin-V/DAPI). 3 x 10⁵ cellules MCA 205 ont été injectées en sous-cutané dans le flanc gauche de souris syngéniques C57BL/6 (H-2^b). Sept jours plus tard, 3 x 10⁴ cellules MCA205 vivantes ont été inoculées dans le flanc droit des souris et la croissance tumorale a été surveillée tous les cinq jours pendant 30 jours. L'absence de tumeur a été interprétée comme une indication de l'efficacité de la vaccination antitumorale. Pour les expériences de déplétions en cellules CD8⁺, les souris ont été injectées avec soit 2.5 mg/mL de l'isotype Contrôle LTF2 de rat IgG2b (#BE0090) ou d'anticorps de souris anti-CD8 α (#BE0061) fournis par BioXcell, deux jours avant la ré-injection avec des cellules vivantes et aux jours 0, 1, 3, 7, 8, 15, 22 et 29. Pour les croissances tumorales en réponse aux différentes combinaisons de chimiothérapies, 5x 10⁵ cellules MCA 205 ont été inoculées dans le flanc des souris immunocompétentes C57BL/6 et immunodéficientes athymiques *nu/nu* (Charles River Laboratory, Wilmington, USA), réparties au hasard dans des groupes de 10. Lorsque le tumeur a atteint 30-40 mm², les souris ont reçu une dose unique, intrapéritonéale de combinaisons de chimiothérapies ou de PBS.

Activation des cellules dendritiques. Cinq x 10⁵ cellules MCA 205 ont été injectées en sous-cutané dans les cuisses de souris C57BL/6. Lorsque les tumeurs ont atteint une taille de 50 mm², les souris ont été traitées de manière systémique et quatre jours après, les ganglions lymphatiques inguinaux ont été prélevés et les cellules ont été re-stimulées *in vitro* par 2 μ g/mL d'anticorps anti-CD3 (#BE0001-1) et 2 μ g/mL d'anticorps anti-CD28 (#BE0015-1) pendant trois jours. Enfin, la concentration en IFN- γ a été évaluée dans les surnageants.

Quantification cytofluorométrique de l'infiltrat lymphocytaire tumoral. Cinq x 10⁵ cellules de fibrosarcomes MCA205 ont été inoculées en sous-cutané à des souris syngéniques C57BL/6. Une semaine plus tard, les souris ont été traitées intrapéritonéalement par PBS, par 5 mg/Kg de MTX, par 0.33 mg/Kg de MitoC ou par 0.33 mg/Kg de MitoC + 2.5 mg/Kg de digoxine. Sept jours plus tard, les tumeurs ont été soigneusement prélevées, coupées en morceaux et incubées pendant 30 min à 37 ° C dans un tampon de digestion (400 U/mL de Liberase TL Research Grade + 150 U/mL de DNase I dans du milieu RPMI 1640). Des suspensions cellulaires ont été obtenues après broyage des tissus digérés et filtrés à 70 µm. Les cellules ont été incubées avec 50 ng/mL de phorbol 12-myristate 13-acétate et 1µg/mL d'ionomycine pendant 4 h à 37 °C pour l'activation de la production intracellulaire de cytokines. Après blocage des interactions non spécifiques par 10 pg/mL d' anti-CD16/CD32 (5 min, +4°C), les cellules ont été lavées avec du PBS et marquées avec des anticorps anti-CD45.2-PerCPCy5.5, anti-CD3-FITC (#17A2, BioLegend), anti-CD4-Pacific Blue (#RM4-5, BD Biosciences), anti-CD8-APC-Cy7 (#53.6.7), anti-TCRδ-APC (#GL-3), anti-IL-17A-PE (#TC11-18H10) et anti-IFNγ-PE-Cy7 (#XMG1.2) conjugués, en suivant les instructions du kit Cytofix/Cytoperm™. Le kit de marquage LIVE/DEAD Fixable Dead Cell® a été utilisé pour discriminer les cellules vivantes et mortes.

Etude clinique rétrospective. L'étude rétrospective du registre de la population des patients de l'Institut Gustave Roussy (Villejuif, France) concerne ceux qui ont été traités avec la digoxine pour une affection cardiaque concomitante au moment du diagnostic du cancer et pendant tout le traitement anticancéreux. Un total de 145 patients atteints de cancers et traités par la digoxine a été enregistré entre 1981 et 2009 et suivi pendant au moins 10 ans après le diagnostic. La survie globale de ces patients a été comparée à celle de 290 patients appariés qui n'ont pas reçu la digoxine. Plus précisément, chacun des patients traités par la digoxine a été apparié à deux patients témoins sur la base de leur sexe, âge au moment du diagnostic, type de tumeur, classification TNM et de leur thérapie.

Analyses statistiques. Les données continues ont été comparées avec le test de Mann–Whitney U et les données catégoriques avec le test de Fisher ou du χ^2 . Les données cliniques et *in vivo* (courbes de survie Kaplan–Meier) ont été comparées avec le test du Log-rank. Toutes les valeurs de *p* ont été obtenues grâce à un test T de Student bilatéral et les valeurs <0.05 ont été considérées comme statistiquement significatives.

RESULTATS

Le criblage d'une bibliothèque de 120 composés anticancéreux couramment utilisés en clinique (*National Cancer Institute's Developmental Therapeutics Program oncology drug set*), grâce aux biosenseurs précédemment cités, a conduit à l'identification de plusieurs chimiothérapies déjà connues comme étant des inducteurs de la MCI. La corrélation entre les différents paramètres évalués (**Fig. 1, B, C, D**) et le haut score de ces composés (**Fig. 1, 2**) a permis de tester la force du système et de valider notre approche de criblage à haut débit.

Identification des GCs comme inducteurs de la MCI

Afin d'identifier de nouveaux agents ayant la capacité d'induire une exposition précoce de la CRT, une sécrétion pré-apoptotique de l'ATP et un relargage tardif d'HMGB1, les cellules U2OS ont été exposées pendant 4h, 12h ou 24h à une bibliothèque de composés approuvés par la *FDA*, suivi de l'évaluation par microscopie à fluorescence de ces trois paramètres. (**Fig. 3A**). Le calcul des scores z (équivalents aux écarts types, ils sont associés à des valeurs de *p* probabilité très petites et figurent dans les extrémités de la distribution normale) a permis d'établir un classement, fortement corrélé à chacun des trois critères de la MCI pris individuellement. Parmi les 10 composés au plus haut score, on retrouve toujours des anthracyclines (doxorubicine, épirubicine et mitoxantrone) et quatre glucosides cardiotoniques (GCs) différents, deux composés utilisés en clinique la digoxine (DIG) et la digitoxine (DGT) et deux molécules expérimentales, la ouabaine et le lanatoside C (**Fig. 3D**). La capacité d'induction des trois paramètres de la MCI par la DIG ou la DGT a ensuite été confirmée par des méthodes alternatives et à des concentrations de l'ordre du nanomolaire dans différentes lignées cancéreuses humaines (**Fig. 3 E-H, Fig. 4**).

Mécanismes d'induction de la MCI par les GCs

Nous avons ensuite découvert que certains mécanismes d'induction de la MCI par les GCs étaient identiques à ceux des anthracyclines [202, 203, 232]. Ainsi, en réponse aux GCs, une induction du stress *pre-mortem* du RE a été observée et mise en évidence ici par l'activation de la phosphorylation d'eIF2 α , de la translocation nucléaire d'ATF6 et de l'épissage de XBP1. (**Supplemental Fig. 2**). En outre, l'exposition de la CRT et la sécrétion d'ATP sont inhibés en présence de Z-VAD-fmk ou d'antioxydants (**Fig. 5A, Supplemental Fig. 3**), suggérant une implication des caspases et des ROS. Les GCs étant des inhibiteurs de la pompe Na⁺/K⁺ ATPase [255] et possédant une plus faible affinité pour la sous-unité murine $\alpha 1$ [256] que pour son homologue humain, nous avons déterminé si l'induction de la MCI

était liée directement ou indirectement à cette inhibition, en transfectant des cellules d'ostéosarcomes U2OS avec l'ADNc codant pour les sous-unités $\alpha 1$ ou $\alpha 3$, murines ou humaines. Ainsi, la protection partielle contre la cytotoxicité des GCs (**Fig. 5B, Fig. 4 supplémentaire**) et la réduction des paramètres de la MCI (**Fig. 5 D-E**) en présence de la sous-unité murine $\alpha 1$ ont permis de conclure à un mécanisme d'action direct par inhibition de la pompe Na^+/K^+ ATPase. Cette pompe régulant les flux ioniques intracellulaires [257], différents ionophores ont été testés pour leur capacité d'activation de l'exposition de la CRT et des relargages d'ATP et d'HMGB1. En effet, l'implication d'un flux calcique été mis en évidence par l'ionophore A23187 et les chélateurs du Ca^{2+} (EDTA : extracellulaire et BAPTAM : intracellulaire) (**Fig. 5A, Fig. 5A, B supplémentaire**). De manière à caractériser plus finement les signalisations impliqués dans la MCI induite par le GCs, des cellules U2OS transfectées par une bibliothèque de siRNA correspondant à 250 gènes cibles impliqués dans la signalisation de la mort cellulaire ont été traitées par de la MTX ou de la DIG. Il faut noter que les voies de signalisation qui régulent l'exposition CRT, la sécrétion de l'ATP et HMGB1 en réponse à la digoxine et à la MTX sont dans l'ensemble relativement dissemblables. (**Fig. 5F**) Toutefois, le regroupement hiérarchique des données a révélé qu'entres autres, les protéines FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*), CRADD (*Death domain-containing protein*) et BAK1 (*Bcl-2 homologous antagonist/killer 1*) étaient impliquées dans les signalisations induisant la MCI. (**Fig. 5G**).

Induction de la MCI par les GCs in vivo

La vaccination anti-tumorale est réalisée par injection de cellules tumorales mourantes (environ 60% d'exposition de phosphatidyl-sérine) dans le flanc de souris syngéniques et l'absence de croissance tumorale après ré-injection (7 jours plus tard) de cellules vivantes en sous-cutanée au niveau du flanc opposé est interprétée comme l'activation d'une réponse immunitaire efficace [160] [155]. Pour ces expériences chez la souris, les GCs ont été combinés à des agents endommageants l'ADN non immunogènes (la cisplatine CDDP et la mitomycine C MitoC) pour obtenir une mortalité cellulaire suffisante, empêchant la croissance des tumeurs au site de vaccination, après lavage des cellules mourantes. Même si les cellules MCA205 (fibrosarcomes) traitées par la CDDP et la MitoC peuvent entraîner la sécrétion d'ATP et le relargage d'HMGB1, elles sont incapables d'induire une exposition pré-apoptotique de la CRT à la membrane. Cependant, ce défaut d'exposition de la CRT peut être corrigé en présence de DIG ou de DIGT. (**Fig. 6A**). Ainsi, il a été observé que la combinaison

de CDDP ou MitoC avec les GCs pouvait stimuler une réponse immunitaire anti-tumorale significative (**Fig. 6B, C**), partiellement inhibée par la déplétion des cellules T CD8+ grâce à un anticorps spécifique. (**Fig. 6A supplémentaire**). En outre, il a été observé qu'après traitement systémique par la MitoC plus DIG de souris porteuses de tumeurs, les cellules productrices d'IFN- γ des ganglions lymphatiques inguinaux étaient trois fois plus nombreuses que dans les souris traitées par la MitoC seule. (**Fig. 6B supplémentaire**). Les GCs restaurent donc la capacité des cellules mourantes traitées par des chimiothérapies non immunogènes à stimuler une réponse immunitaire anticancéreuse. Enfin, les expériences de croissance tumorale chez des souris immunocompétentes et immunodéficientes ont révélé que le traitement systémique par la MitoC, la CDDP ou la DIG avaient peu d'effets sur la croissance des tumeurs, alors que la combinaison de MitoC ou CDDP plus digoxine apportait un bénéfice thérapeutique significatif (**Fig. 6D, E**). Cet effet n'a toutefois pas été observé dans les hôtes immunodéficients (**Fig. 6F, G**). En outre, l'étude de l'infiltrat tumoral a mis en évidence la présence de cellules T γ/δ productrices d'IL-17A et de cellules T CD4+ ou CD8+ productrices d'IFN- γ (**Fig. 6C supplémentaire**), révélant une réponse immunitaire anticancéreuse locale.

Amélioration de la survie globale des patients atteints de carcinomes par la DIG

Grâce à un algorithme de recherche, nous avons identifié les patients atteints de carcinomes et répertoriés dans les archives de l'IGR entre 1981 et 2009, ayant reçus de la digoxine au cours de leur traitement conventionnel. Nous avons ainsi comparé la survie globale de 145 de ces patients à celle de 290 patients n'ayant pas reçu de DIG. Les patients ont été appariés (1:2) en fonction de l'âge, du genre, de la thérapie et des principaux facteurs pronostiques (**Fig. 7A, Fig. 7-9 supplémentaire**). Il alors été constaté une amélioration significative de la survie globale des patients traités à la DIG (**Fig. 7B**). Les patients n'ayant pas reçu de DIG présentent une survie moyenne de 52% (45% - 58%) à 5 ans, alors que la survie moyenne des patients traités par la DIG est de 65% (56% - 73%) (Log-rank $p=0.002$). Le hazard ratio de la mort est de 0.62 (IC95%: 0.46 - 0.84) pour les patients traités par DIG. Plus précisément, nous avons constaté que la prise de digoxine avait un impact positif sur la survie globale des patients atteints de cancers du sein, colorectal, ORL et hépatocellulaire. (**Fig. 7C, Fig. 8-10 supplémentaire**). Enfin, des analyses plus approfondies de certains sous-groupes ont révélé que la digoxine n'affectait pas la survie globale des patients traités par des agents chimiothérapeutiques immunogènes (anthracyclines pour les cancers du sein et

oxaliplatine pour les cancers colorectaux). En revanche, la digoxine a un impact significativement positif sur la survie des patients ayant reçu des agents autres que les anthracyclines ou l'oxaliplatine (**Fig. 7D,E**).

CANCER

Cardiac Glycosides Exert Anticancer Effects by Inducing Immunogenic Cell Death

Laurie Menger,^{1,2,3} Erika Vacchelli,^{1,2,3} Sandy Adjemian,^{1,2,3} Isabelle Martins,^{1,2,3} Yuting Ma,^{1,2,3} Shensi Shen,^{1,2,3} Takahiro Yamazaki,^{2,3,4} Abdul Qader Sukkurwala,^{1,2,3} Mickaël Michaud,^{1,2,3} Grégoire Mignot,^{5,6} Frederic Schlemmer,^{1,2,3} Eric Sulpice,⁷ Clara Locher,^{2,3,4} Xavier Gidrol,⁷ François Ghiringhelli,^{5,6} Nazanine Modjtahedi,^{1,2,3} Lorenzo Galluzzi,^{2,8} Fabrice André,^{2,9} Laurence Zitvogel,^{2,3,4} Oliver Kepp,^{1,2,3,*†} Guido Kroemer^{1,8,10,11,12,*†}

Some successful chemotherapeutics, notably anthracyclines and oxaliplatin, induce a type of cell stress and death that is immunogenic, hence converting the patient's dying cancer cells into a vaccine that stimulates antitumor immune responses. By means of a fluorescence microscopy platform that allows for the automated detection of the biochemical hallmarks of such a peculiar cell death modality, we identified cardiac glycosides (CGs) as exceptionally efficient inducers of immunogenic cell death, an effect that was associated with the inhibition of the plasma membrane Na⁺- and K⁺-dependent adenosine triphosphatase (Na⁺/K⁺-ATPase). CGs exacerbated the antineoplastic effects of DNA-damaging agents in immunocompetent but not immunodeficient mice. Moreover, cancer cells succumbing to a combination of chemotherapy plus CGs could vaccinate syngeneic mice against a subsequent challenge with living cells of the same type. Finally, retrospective clinical analyses revealed that the administration of the CG digoxin during chemotherapy had a positive impact on overall survival in cohorts of breast, colorectal, head and neck, and hepatocellular carcinoma patients, especially when they were treated with agents other than anthracyclines and oxaliplatin.

INTRODUCTION

Primary or transplantable tumors respond to chemotherapy with anthracyclines or oxaliplatin much more efficiently when they are implanted in syngeneic immunocompetent mice rather than in immunodeficient hosts (1–3). Along similar lines, clinical studies demonstrate that severe lymphopenia negatively affects prognosis in multiple distinct solid cancers subjected to chemotherapy (4). These findings suggest that immune responses elicited by chemotherapy may play a decisive role in the outcome of anticancer therapy (5, 6).

Although most chemotherapeutics fail to trigger immunogenic cell death (ICD), some (like anthracyclines and oxaliplatin) are able to do so (1, 2, 7). Cancer cells succumbing to ICD can vaccinate mice against a subsequent challenge with living cells of the same type (1, 2, 7) or elicit anticancer immune responses in patients (8). Extensive biochemical analyses have revealed the distinctive properties of immunogenic (as opposed to nonimmunogenic) cell death. These turned out to be the preapoptotic exposure of calreticulin (CRT) at the cell surface (2, 8, 9), the secretion of adenosine 5'-triphosphate (ATP) from stressed and dying cells (7, 10), and the cell death-associated release of the nuclear high mobility group box 1 (HMGB1) protein (2, 11). CRT stimulates

the engulfment of dying cancer cells by dendritic cells (DCs) (2). HMGB1 acts on Toll-like receptor 4 (TLR4), hence eliciting a myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88)-mediated response that underpins optimal tumor antigen processing by DCs (2, 11). ATP binds purinergic P2RX7 receptors [thus activating the nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family, pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome] to stimulate the production of interleukin-1 β (IL-1 β), which is required for stimulating interferon- γ (IFN- γ) production by tumor-specific CD8⁺ T lymphocytes (7). Knockout of *Tlr4* or *P2rx7* (as well as that of genes coding for their downstream signal transducers including *Myd88*, *Nlrp3*, *Il1r*, and *Ifng*) phenocopies the ablation of the cellular immune system, meaning that tumors growing in *Tlr4*^{-/-}, *P2rx7*^{-/-}, *Myd88*^{-/-}, *Nlrp3*^{-/-}, *Il1r*^{-/-}, *Ifng*^{-/-}, *Ifngr*^{-/-}, athymic, or CD8⁺ T cell-depleted mice all fail to respond to immunogenic chemotherapeutic regimens. Along similar lines, single-nucleotide polymorphisms that compromise the function of human TLR4 or P2RX7 are negative predictors of the clinical response to adjuvant chemotherapy with anthracyclines (in breast cancer) or oxaliplatin (in colorectal cancer) (2, 7, 12). These results suggest the possible translational relevance of the data obtained in mouse models, implying the oblique contribution of anticancer immune responses to the success of ICD-inducing chemotherapies.

The capacity of anthracyclines and oxaliplatin to induce ICD relies, at least in part, on off-target effects. These agents indeed trigger an endoplasmic reticulum (ER) stress response that leads to CRT exposure even in cytoplasts, that is, cells that have been enucleated and hence lack the best-known target of these chemotherapeutics (DNA) (2, 13). Although all anthracyclines that have been tested so far induce ICD (2), platinum compounds are heterogeneous in this regard. Thus, in contrast to oxaliplatin, cisplatin [*cis*-diamminedichloroplatinum(II) (CDDP)] is unable to induce an ER stress response followed by ICD (12, 14), meaning that there is no simple structure-function relationship that would predict

¹INSERM, U848, F-94805 Villejuif, France. ²Institut Gustave Roussy, F-94805 Villejuif, France. ³Université Paris-Sud (Paris XI), F-94276 Le Kremlin-Bicêtre, France. ⁴INSERM, U1015, F-94805 Villejuif, France. ⁵Department of Medical Oncology, Georges-François Leclerc Center, F-21000 Dijon, France. ⁶INSERM Avenir Team, CRI-866, Université de Bourgogne, F-21000 Dijon, France. ⁷Laboratoire Biologie à Grande Echelle, Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives, INSERM, U1038, Université Joseph Fourier, F-38054 Grenoble, France. ⁸Université Paris Descartes (Paris V), Sorbonne Paris Cité, F-75270 Paris, France. ⁹INSERM, U981, F-94805 Villejuif, France. ¹⁰Metabolomics Platform, Institut Gustave Roussy, F-94805 Villejuif, France. ¹¹Centre de Recherche des Cordeliers, F-75005 Paris, France. ¹²Pôle de Biologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, F-75908 Paris, France.

*These authors contributed equally to this work.

†To whom correspondence should be addressed. E-mail: oliver.kepp@igr.fr (O.K.); kroemer@orange.fr (G.K.)

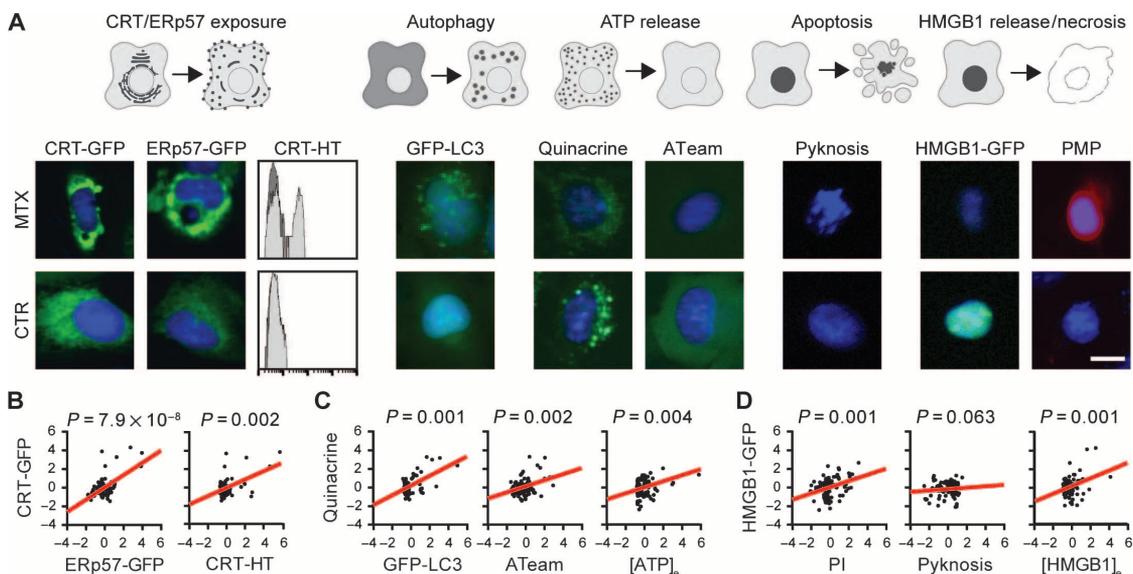


Fig. 1. A fluorescent biosensor-based platform for the identification of ICD inducers. **(A)** Schematic representation of the bioassay with representative confocal fluorescence microphotographs of control (CTR) and MTX-treated cells. **(B to D)** Human osteosarcoma U2OS cells expressing the indicated biosensors were exposed to a collection of 120 different cytotoxic agents (final concentration, 1 μ M), and ICD-related parameters were measured. Each point represents the mean of duplicate determinations for each drug. Scale bar, 10 μ m. **(B)** Relationship between CRT-GFP granularity (a parameter that indicates the clustering of CRT at the cell periphery) and ERp57-GFP granularity or CRT-HT exposure, as determined 4 hours after

addition of the drugs. **(C)** Relationship between the loss of quinacrine staining (represented by positive values), the formation of cytoplasmic GFP-LC3 puncta, the intracellular ATP concentration, as determined with an ATP-sensing FRET probe (ATeam), and the extracellular ATP concentrations, as determined by means of a commercial luciferase-based assay. **(D)** Relationship between HMGB1-GFP release (represented by positive values), plasma membrane permeabilization (PMP) (monitored with PI), pyknosis (nuclear shrinkage, represented by positive values), and extracellular HMGB1 concentrations (measured by ELISA). *P* values calculated with the Pearson test are indicated in each graph.

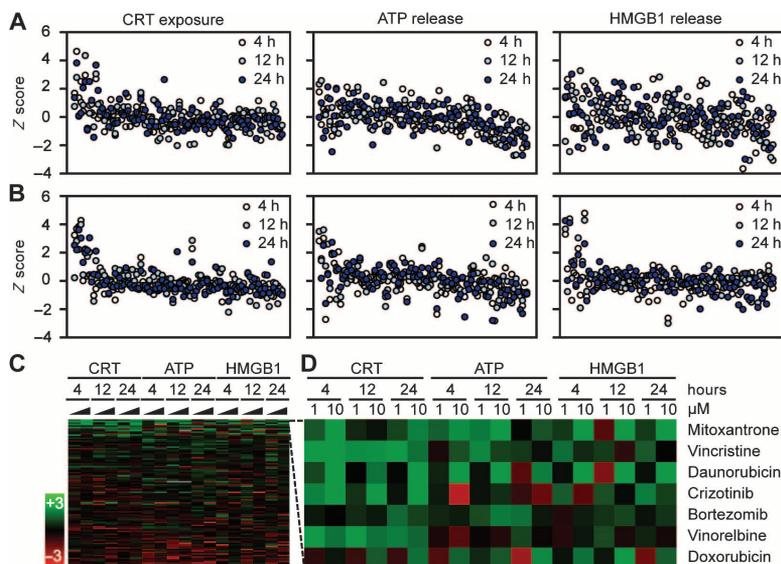


Fig. 2. Identification of ICD inducers among 120 anticancer agents. **(A and B)** Human osteosarcoma U2OS cells stably coexpressing CRT-GFP and H2B-RFP (histone 2B–red fluorescent protein) or HMGB1-GFP and H2B-RFP as well as wild-type (WT) U2OS cells were treated with compounds from the National Cancer Institute’s Developmental Therapeutics Program oncology drug set [final concentration, 1 μ M (A) or 10 μ M (B)] for the indicated time, followed by the assessment of ICD-related parameters. Results (means, $n = 3$; each point represents one agent) have been sorted according to mean Z score for each agent to highlight the nonlinear time dependency of the appearance of distinct ICD characteristics. **(C)** Hierarchical clustering of drug effects. **(D)** Hits. Green and red values indicate positive and negative effects (Z score), respectively.

the capacity to cause ICD. As a result, ICD inducers have thus far been identified empirically by determining whether mouse cancer cells responding to them would elicit a protective immune response *in vivo* (1, 2, 15).

To overcome this limitation, we designed an automated epifluorescence microscopy-based platform allowing for the detection of the known biochemical hallmarks of ICD in human cancer cells stably expressing fluorescent biosensors. Using this platform, which is suitable for high-content, medium-throughput analyses, we identified cardiac glycosides (CGs) as a class of agents that induce bona fide ICD and improve the clinical outcome of anticancer chemotherapies.

RESULTS

Measuring ICD parameters by fluorescent biosensors

The known parameters determining ICD are the cotranslocation of CRT and the ER chaperon ERp57 at the cell surface (2, 16), the autophagy-dependent secretion of ATP (7, 10), and the release of the non-histone chromatin protein HMGB1 (2), which occur before, during, and after apoptosis, respectively (2, 7, 13). Human osteosarcoma U2OS cells were used to screen a chemical library encompassing all the 120 anticancer drugs that are currently used in the clinic (final

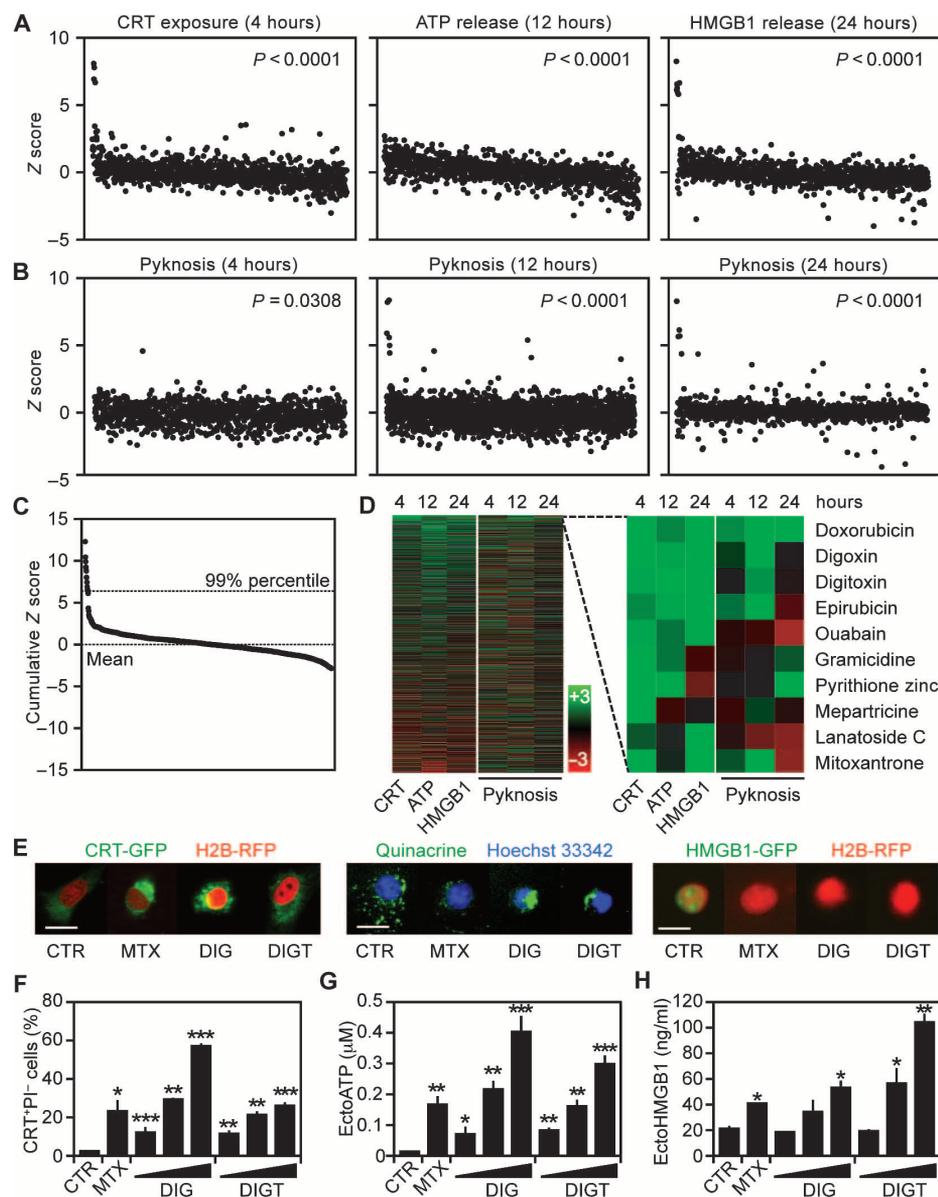


Fig. 3. Identification of ICD inducers among 1040 FDA-approved drugs. (A to C) Human osteosarcoma U2OS cells stably coexpressing CRT-GFP and H2B-RFP or HMGB1-GFP and H2B-RFP as well as WT U2OS cells were treated with FDA-approved or experimental drugs at a final concentration of 1 μ M for the indicated time and then assessed for CRT-GFP granularity (a surrogate marker of CRT exposure), cytoplasmic quinacrine fluorescence (after staining with the ATP-sensitive dye quinacrine), and nuclear HMGB1-GFP fluorescence. Nuclear shrinkage (an indicator of apoptotic cell death) was monitored by the H2B-RFP signal or upon Hoechst 33342 staining. Z scores of two independent experiments conducted in duplicates upon interplate normalization are depicted in (A) and (B). The sum of the Z scores of the monitored ICD hallmarks is shown in (C). *P* values were calculated with respect to the values shown in (C). (D) A heat map of CRT exposure, ATP release, HMGB1 translocation, and nuclear shrinkage is presented for the entire library (left panel) and for compounds that belong to the upper 1% percentile (right panel). (E) Representative images depict the formation of CRT-containing granules, the secretion of ATP from quinacrine⁺ ATP-containing vesicles, and the release of HMGB1 from the nucleus, 4, 12, or 24 hours, respectively, after the administration of MTX, DIG, or DIGT. Scale bars, 10 μ m. (F to H) WT U2OS cells were treated with 1 μ M MTX or increasing concentrations of DIG and DIGT (10, 50, and 100 nM) for 4, 12, or 24 hours and then subjected to cytofluorometric immunodetection of CRT exposure (F), luciferase-based detection of ATP (G), and the assessment of extracellular HMGB1 by ELISA (H), respectively. Columns report the percentage of live cells exhibiting CRT exposure (CRT⁺PI⁻) and the concentrations of extracellular ATP and HMGB1 (mean \pm SEM; *n* = 3; **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001, two-tailed Student's *t* test, compared to CTR cells).

concentrations, 1 and 10 μ M, and ICD-related parameters were measured (time points, 4, 12, and 24 hours) by robotized epifluorescence microscopy followed by automated image analysis (Fig. 1A). The translocation of a CRT-GFP (green fluorescent protein) fusion protein (14) from the perinuclear ER to the cellular periphery paralleled a similar relocalization of ERp57-GFP (16), as well as the exposure of a CRT-HaloTag fusion protein on the cell surface (detected with a plasma membrane impermeant HaloTag ligand) (14) (Fig. 1B). The staining obtained with an ATP-sensitive fluorophore, quinacrine (17), was comparable to the ATP-dependent signal given by a fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based biomarker relying on the ϵ subunit of the bacterial F_1F_0 -ATP synthase flanked by cyan and yellow fluorescent proteins (18). The reduction of intracellular ATP could be detected with quinacrine as well as by means of a luciferase-based assay to measure extracellular ATP concentrations. Moreover, the loss of quinacrine-dependent fluorescence was paralleled by the aggregation of a GFP-LC3 fusion protein in cytoplasmic puncta (autophagosomes or autophagolysosomes) (19) (Fig. 1C), in accord with the observation that autophagy is required for ATP release from dying tumor cells (10). HMGB1 release was detected as a loss in the nuclear fluorescence of an HMGB1-GFP chimera (20) or as an accumulation of extracellular HMGB1 [detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)] and occurred in conjunction with plasma membrane breakdown [as measured with the vital dye propidium iodide (PI)], in turn reflecting primary or secondary (postapoptotic) necrosis (21) but not with apoptotic chromatin condensation (Fig. 1D). Among the seven compounds that most effectively triggered the known hallmarks of ICD, as determined by the hierarchical clustering of data on CRT translocation, nuclear HMGB1 loss, and cellular ATP release (Fig. 2, A and B), were several known ICD inducers (Fig. 2, C and D), namely, three anthracyclines [daunorubicin, doxorubicin, and mitoxantrone (MTX)] (1, 2), as well as bortezomib (22). In addition, this list included two vinca alkaloids with known immunogenic side effects (vincristine and vinorelbine) (23, 24), as well as the tyrosine kinase inhibitor crizotinib, for

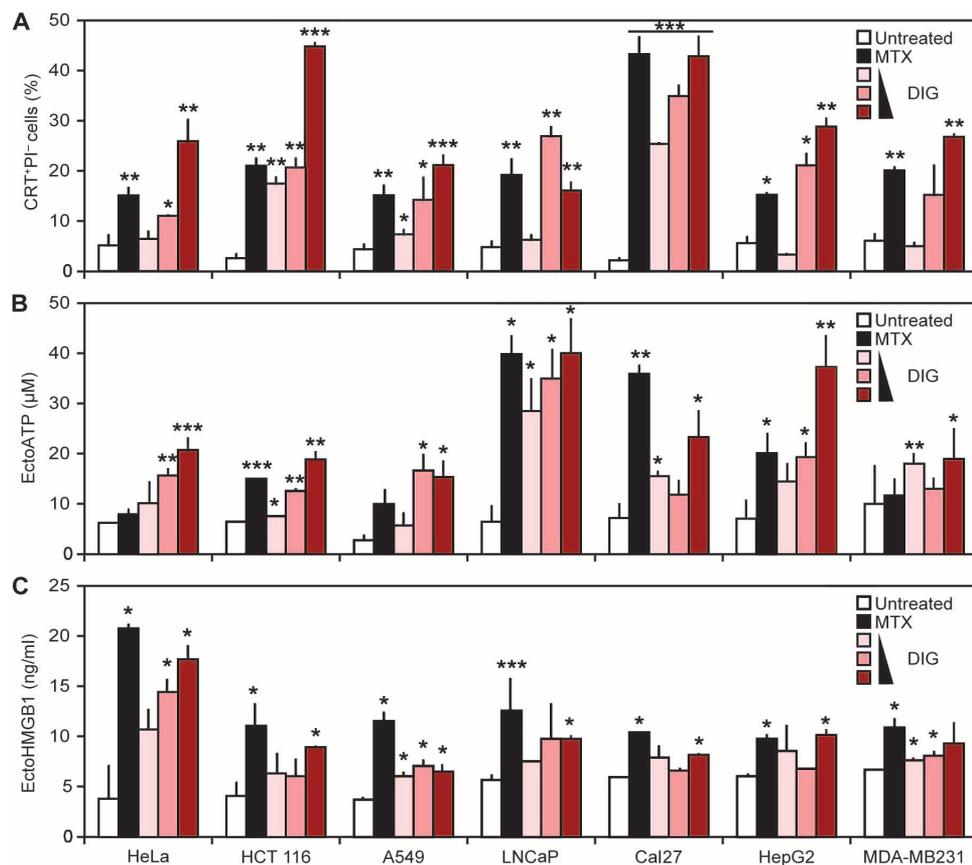


Fig. 4. ICD induction by CGs in a panel of human cancer cell lines. (A) Cervical adenocarcinoma HeLa cells, colon adenocarcinoma HCT 116 cells, non-small cell lung carcinoma A549 cells, prostate carcinoma LNCaP cells, oral squamous carcinoma Cal27 cells, hepatocellular carcinoma HepG2 cells, and breast adenocarcinoma MDA-MB 231 cells were treated with 1 μ M MTX or 10 nM, 100 nM, and 1 μ M DIG for 4 hours, followed by immunostaining and cytofluorometric detection of cell surface-exposed CRT. (B and C) Alternatively, cells were treated as in (A) but for 12 and 24 hours, followed by the assessment of extracellular ATP by means of a luciferase-based assay (B) and the release of HMGB1 into the supernatant by means of an HMGB1-specific ELISA (C). Data are reported as means \pm SEM ($n = 3$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$, two-tailed Student's t test, compared to CTR cells).

which no immunological effects have been reported thus far. Thus, known ICD inducers yielded high scores and were identified on the basis of the use of surrogate ICD markers, validating our screening approach.

Identification of CGs as candidate inducers of ICD

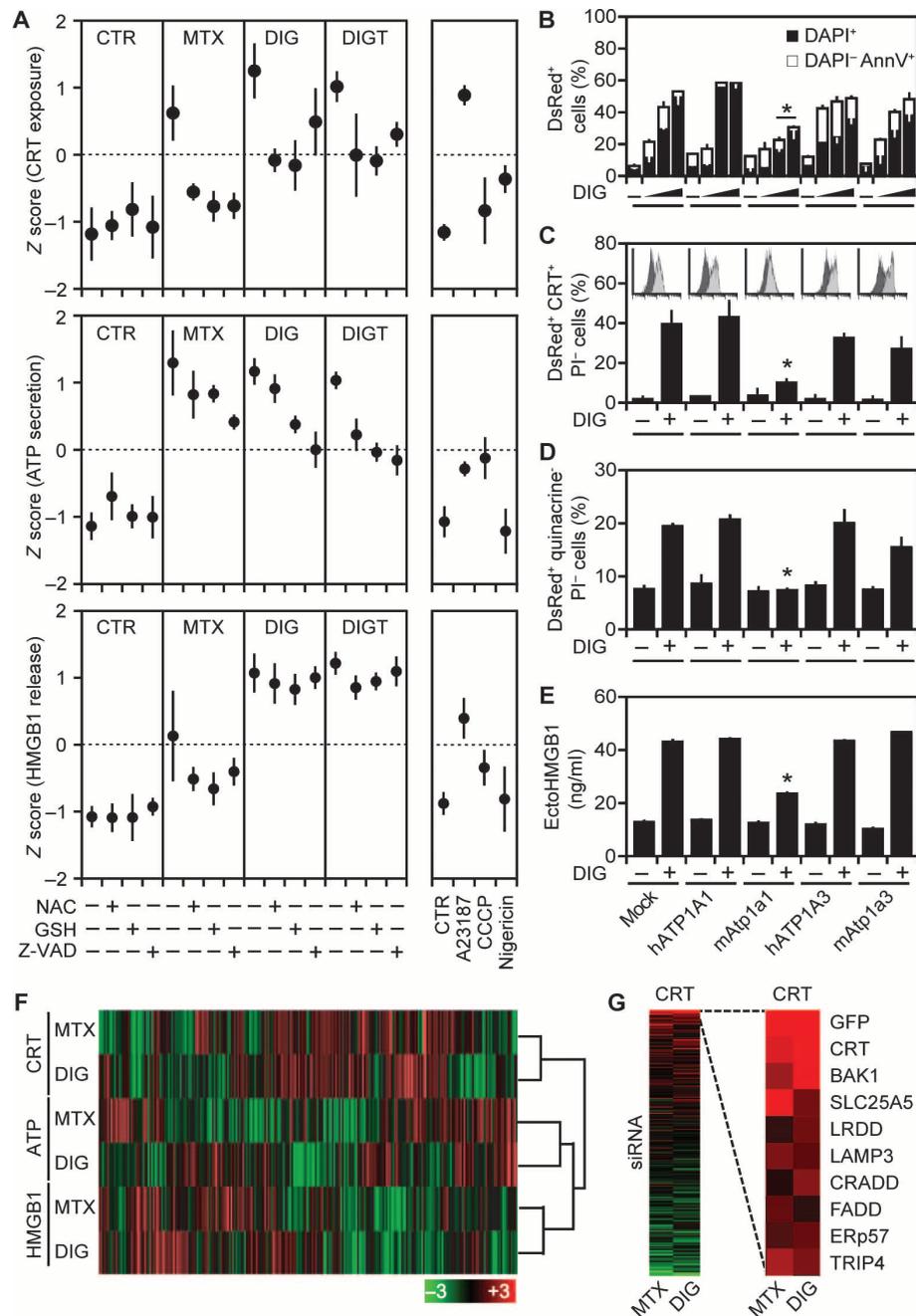
To identify novel agents endowed with the capacity to stimulate ICD, we exposed human osteosarcoma U2OS cells for 4, 12, or 24 hours to a chemical library encompassing all U.S. Food and Drug Administration (FDA)-approved (and some experimental) drugs (final concentration, 1 μ M), followed by the assessment of CRT exposure, ATP release, and HMGB1 loss (Fig. 3A). Apoptotic nuclear shrinkage was measured continuously (Fig. 3B and table S1). The arithmetic sum of the Z scores of the three ICD parameters (Fig. 3C) established a rank that strongly correlated with each of the three ICD criteria taken individually (Fig. 3A), as well as with apoptosis induction at each time point, although to a lower extent (Fig. 3B). Three distinct anthracyclines (doxorubicin, epirubicin, and MTX), whose capacity to induce ICD is amply documented (2, 7), ranked among the 10 best hits, corresponding to the 1% upper percentile of the 1040 FDA-approved or -evaluated agents.

Unexpectedly, four different CGs, the two clinically used agents digoxin (DIG) and digitoxin (DIGT) as well as two experimental compounds, ouabain and lanatoside C, were also found in this top 10 list (Fig. 3D). Visual inspection of fluorescence images confirmed that DIG and DIGT stimulated the three ICD hallmarks as efficiently as MTX, which we used as a positive control (Fig. 3E). Moreover, experiments in which the hallmarks of ICD were measured by alternative methods (immunofluorescence staining of cell surface-exposed CRT, luciferase-based detection of extracellular ATP, and ELISA for the quantification of HMGB1 in culture supernatants) corroborated the capacity of DIG and DIGT to induce manifestations of ICD in several human cancer cell lines (Figs. 3, F to H, and 4). Moreover, CGs induced the exposure of heat shock protein 90 kD (Hsp90), yet another hallmark of ICD (22), on the cell surface (fig. S1). Together, these results suggest that CGs might constitute novel inducers of ICD, prompting us to investigate the underlying molecular mechanisms and the *in vivo* relevance of our observations.

Mechanisms of CG-induced ICD

ICD inducers are known to activate a premortem ER stress response (2, 12, 13), and CGs did activate three arms of the ER stress response [that is, phosphorylation of eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2 α), nuclear translocation of ATF6 (activating transcription factor 6), and splicing of XBP1 (X-box binding protein 1)] at least as efficiently as MTX (fig. S2). The broad-spectrum caspase inhibitor Z-VAD-fmk (*N*-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone) as well as the antioxidants *N*-acetylcysteine and reduced glutathione inhibited not only the cytotoxicity of CGs but also CRT exposure and ATP release (Fig. 5A and fig. S3). Thus, the induction of ICD hallmarks by DIG or DIGT is intimately linked to their cytotoxic potential. CGs are known to target the plasma membrane Na⁺,K⁺-ATPase (Na⁺- and K⁺-dependent adenosine triphosphatase), thus reducing the Na⁺ and K⁺ gradients and stimulating Ca²⁺ influx (25). Taking advantage of the fact that DIG and DIGT have a far lower affinity for the murine Na⁺,K⁺-ATPase subunit α_1 than for its human counterpart (26, 27), we determined whether ICD induction by CGs is mediated by on-target or off-target effects. Human U2OS cells transfected with mouse α_1 (but not with human α_1 or another mouse subunit, α_3) were indeed partially protected from CG cytotoxicity (Fig. 5B and fig. S4) and exhibited reduced CRT exposure (Fig. 5C), ATP secretion (Fig. 5D), and HMGB1 release (Fig. 5E). These results suggest that CGs induce ICD characteristics through their effects on Na⁺,K⁺-ATPase-regulated ion fluxes. Accordingly, the Ca²⁺ ionophore A23187 (but neither the K⁺ ionophore nigericin nor the protonophore

Fig. 5. Mechanisms of CG-induced ICD. **(A)** Pharmacological modulation of ICD signals. Human osteosarcoma U2OS cells were kept in the absence (CTR) or in the presence of the indicated cytotoxic compounds, alone or in combination with the indicated cytoprotective agents (left panel) or ionophores (right panel), and ICD hallmarks were assessed by high-content image analysis based on biosensor cell lines as in Fig. 1. Results are means \pm SEM of $n = 3$ independent experiments. **(B to E)** Implication of Na^+, K^+ -ATPase in DIG-induced ICD. U2OS cells transfected with the human or mouse homologs of the Na^+, K^+ -ATPase subunits α_1 and α_3 plus DsRed (to gate on transfected cells) were cultured in the absence or presence of DIG for 24 hours, followed by the cytofluorometric detection of phosphatidylserine exposure and exclusion dye [4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI)] uptake (B). Black and white columns in (B) report the percentage of dead (DAPI⁺) and dying (DAPI⁻AnnV⁺) cells (mean \pm SEM; $n = 3$; * $P < 0.05$, two-tailed Student's t test, compared to mock-transfected cells treated with the same DIG concentration; AnnV, annexin V). Alternatively, CRT exposure was assessed using HaloTag-CRT-expressing U2OS cells (C). Inserts in (C) show the shift in HaloTag-Alexa Fluor 488 binding, indicative of CRT exposure, from control to treated conditions. ATP secretion (D) and HMGB1 release (E) were monitored as in Fig. 1. **(F and G)** siRNA-based screening of cellular signaling pathways involved in MTX- or DIG-induced ICD. An array of siRNA pairs targeting 250 distinct cell death or stress-relevant genes was reverse-transfected in U2OS cells, which were then cultured in control conditions or exposed to MTX and DIG. The capacity of siRNAs to reduce (red) and enhance (green) ICD hallmarks was assessed as in Fig. 1. Unsupervised hierarchical clustering of data is shown in (F), and the proteins whose inhibition most efficiently inhibited CRT exposure as elicited by MTX and DIG are shown in (G). See table S2 for a full list of siRNAs and their effects.



carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone) was able to induce CRT exposure, ATP secretion, and HMGB1 release (Fig. 5A and fig. S5A), and these effects were prevented by both intracellular and extracellular Ca^{2+} chelators (fig. S5B). To further investigate the mechanisms through which CGs induce manifestations of ICD, we reverse-transfected U2OS cells with an array of 500 siRNA (small interfering RNA) duplexes, corresponding to 250 target genes involved in cell death signaling, and monitored their response to MTX and DIG (the most widely used CG in the clinic) (28) in terms of CRT exposure, ATP secretion, and HMGB1 release. As revealed by unsupervised hierarchical clustering, the signaling pathways that regulate CRT exposure, ATP secretion, and HMGB1 release in response to DIG and MTX are overall relatively dissimilar, yet present consistent overlaps (Fig. 5F and table S2). For instance, DIG- and MTX-

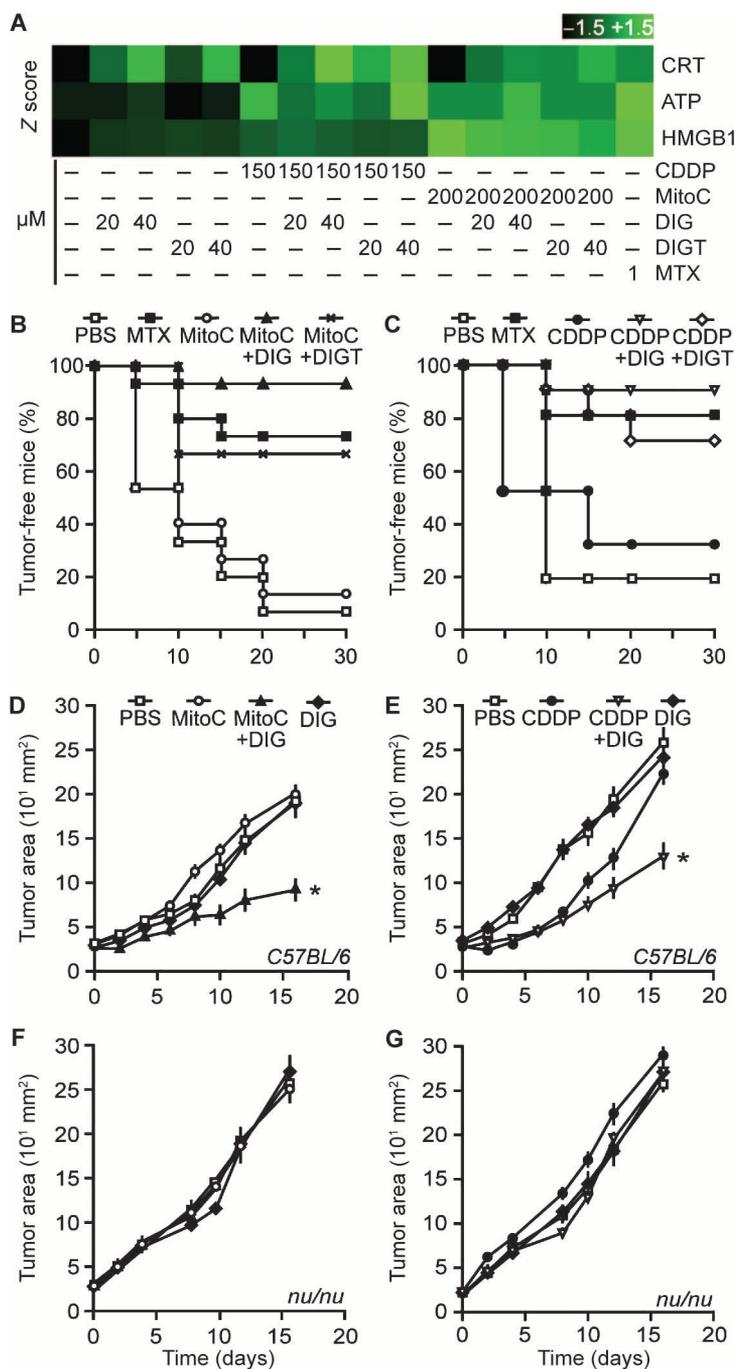
induced CRT exposure, the prime ICD characteristic, was disrupted by the knockdown of a largely overlapping cluster of target genes (Fig. 5G). Among the siRNAs that most effectively prevented DIG- and MTX-stimulated CRT exposure, two targeted death domain-containing proteins (FADD and CRADD), and two others targeted proteins that have been previously implicated in MTX-induced CRT exposure, namely, ERp57 (16) and BAK1, a proapoptotic multidomain protein from the BCL-2 family (13). Although the interpretation of this data set is limited by the suboptimal efficacy of reverse transfection arrays, these results underscore that CGs and anthracyclines stimulate overlapping pathways of ICD signaling.

Fig. 6. Restoration of the immunogenicity of CDDP and MitoC in vivo. **(A)** Murine fibrosarcoma MCA205 cells were treated with 1 μ M MTX, 200 μ M MitoC, or 150 μ M CDDP, alone or combined with the indicated concentrations of DIG and DIGT, for 24 hours, followed by the determination of CRT exposure (by immunofluorescence), ATP secretion (upon quinacrine staining), and HMGB1 release (by ELISA). Results are shown as a heat map. **(B and C)** MCA205 cells treated for 24 hours with 1 μ M MTX, 200 μ M MitoC, or 150 μ M CDDP alone or combined with 20 μ M DIG or 40 μ M DIGT were inoculated into immunocompetent C57BL/6 mice, which were rechallenged 7 days later with living cells of the same type. The percentage of tumor-free mice was evaluated every 5 days for the following 30 days ($n = 15$). **(D to G)** Live MCA205 cells were injected subcutaneously into immunocompetent C57BL/6 mice (D and E) or immunodeficient *nu/nu* mice (F and G). When tumors became palpable, mice were intraperitoneally injected with DIG (2.5 mg/kg), MitoC (0.33 mg/kg), and CDDP (0.22 mg/kg), alone or combined as indicated, and tumor growth was assessed regularly for the next 20 days (* $P < 0.01$, two-tailed Student's *t* test, compared to all other groups, $n = 10$).

ICD induced by CGs in vivo

In tumor vaccination experiments, cancer cells were exposed to cytotoxic chemotherapeutics in vitro until $70 \pm 10\%$ of the cells expose phosphatidylserine on the outer leaflet of the plasma membrane, as assessed by means of annexin V binding. Dying cancer cells were then injected subcutaneously into mice, and 1 week later, the animals were rechallenged with live tumor cells of the same kind, injected into the opposite flank. The absence of tumor growth is interpreted as the sign of a productive anticancer immune response (1, 2, 14). In a first series of experiments involving DIG- or DIGT-exposed cancer cells, mice developed cancers at the primary injection site, presumably because the washing out of CGs allowed for the rapid recovery of viable cells and their growth in vivo. In contrast, cells treated with the DNA-damaging agents CDDP and MitoC (mitomycin C) failed to form tumors at the primary injection site. In this assay, however, CDDP and MitoC were unable to induce ICD, meaning that tumor cells killed by these agents and injected into mice failed to trigger a protective anticancer immune response (1, 2, 14). Accordingly, CDDP and MitoC were unable to induce preapoptotic CRT exposure in vitro, although they did trigger ATP secretion and HMGB1 release. This defect in CRT exposure was corrected in the presence of DIG or DIGT (Fig. 6A). Accordingly, when murine cancer cells were treated with a combination of CDDP or MitoC plus DIG or DIGT, such cells lost their growth potential and acquired the capacity to stimulate a productive immune response in vaccination experiments (Fig. 6, B and C). This immune response was partially lost upon antibody-mediated depletion of CD8⁺ T cells (fig. S6A). After systemic treatment of tumor-bearing mice with MitoC plus DIG, inguinal lymph node cells secreted higher amounts of IFN- γ compared to cells isolated from mice receiving MitoC alone, as shown upon recovery of draining popliteal lymph node cells and stimulation with anti-CD3 plus anti-CD28 antibodies (fig. S6B). Thus, CGs restored the capacity of dying cells to stimulate anticancer immune responses in conditions in which nonimmunogenic chemotherapeutics alone failed to do so.

Subsequently, we evaluated the capacity of DIG to improve the response to therapy of established cancers growing on immunocom-



petent or immunodeficient mice. In conditions in which systemic chemotherapy with MitoC, CDDP, or DIG alone had minor effects on tumor growth, the combination of MitoC or CDDP plus DIG induced a significant therapeutic benefit (Fig. 6, D and E). This effect was observed when tumors grew on immunocompetent mice, yet was lost when the tumors proliferated on athymic (*nu/nu*) mice (Fig. 6, F and G). These results underscore the obligate contribution of the immune system to the chemotherapeutic activity of DIG. Indeed, the administration of MitoC plus DIG induced tumor infiltration by IL-17A-producing γ/δ T cells and IFN- γ -producing CD4⁺ or CD8⁺ T cells as

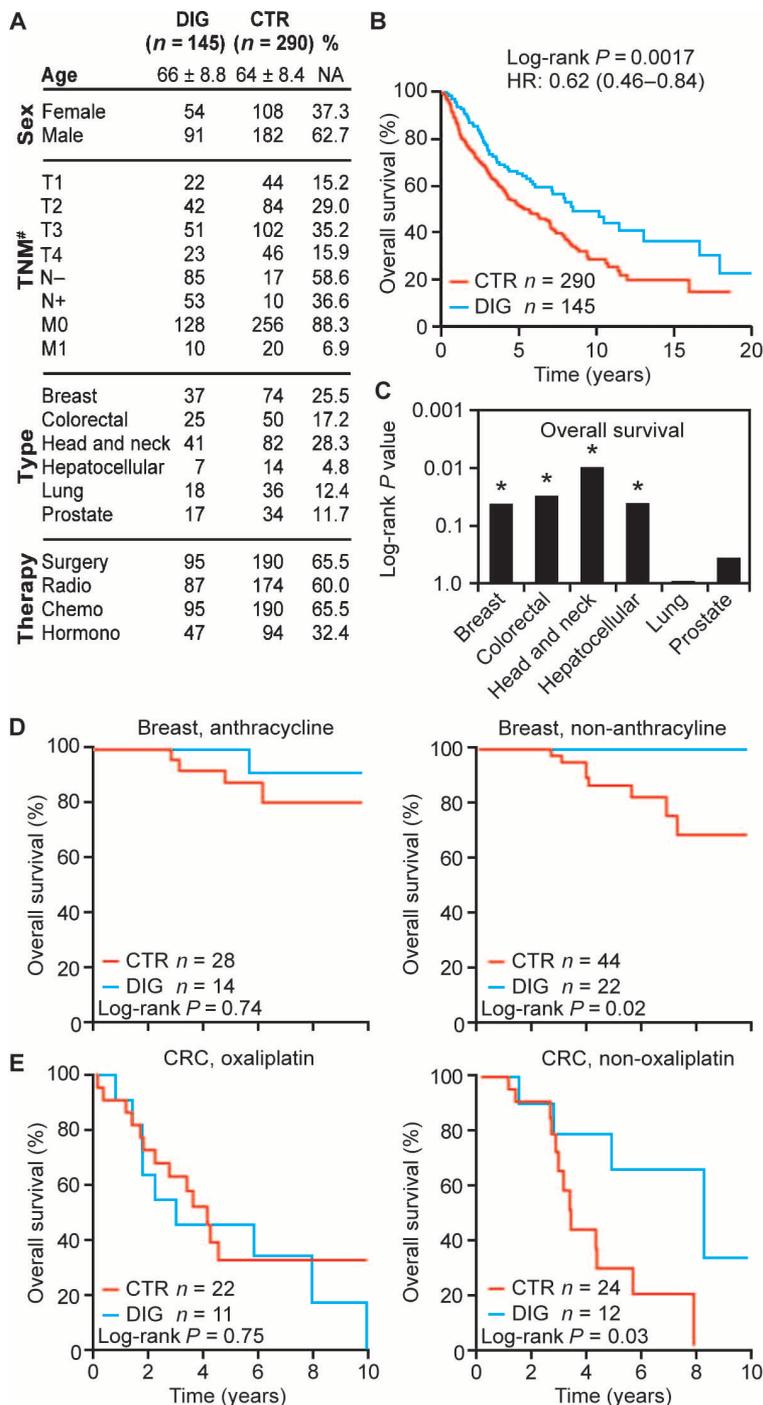


Fig. 7. Increase in the overall survival of carcinoma patients by CGs. **(A and B)** Effect of DIG on breast carcinoma patients. The overall survival of DIG-treated carcinoma patients and case-matched patients who underwent similar treatments (A) (for additional patient characteristics, see figs. S7 to S10) is reported (B). **(C)** Statistical impact of DIG treatment on the overall survival of cancer patients. Columns report the P value obtained by the comparison of DIG-treated and case-matched patients (log-rank test). **(D and E)** Impact of DIG on overall survival in the context of immunogenic versus nonimmunogenic chemotherapy. Overall survival of breast cancer patients who received anthracycline-based or non-anthracycline-based chemotherapy alone or combined with DIG (D). Colorectal cancer (CRC) patients were subdivided in oxaliplatin and non-oxaliplatin-receiving individuals, and the overall survival of DIG-treated versus control patients was estimated (E). #Not matched on etiology and α -fetoprotein. NA, not applicable; HR, hazard ratio.

efficiently as MTX did (fig. S6C), demonstrating the elicitation of a local anticancer immune response.

Next, we used a text-based research algorithm to identify all carcinoma patients who, between 1981 and 2009, received CGs (in particular, DIG) during conventional carcinoma therapies, as documented in the computerized archives held at Institut Gustave Roussy. We compared the overall survival of 145 patients treated with CGs with that of 290 patients who did not receive CGs. Patients were matched (1:2) for tumor type, stage, anticancer therapy, gender, and major prognostic parameters [such as estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression for breast cancer, etiology and α -fetoprotein for hepatocellular cancer, and Gleason score for prostate cancer] (Fig. 7A and figs. S7 to S9). DIG-treated patients exhibited a significantly enhanced overall survival (Fig. 7B) compared to age- and sex-matched patients with similar tumor characteristics (tumor type and stage) and receiving similar treatment but no CGs. Patients who did not receive CGs presented a 52% (45 to 58%) survival at 5 years, whereas patients treated with CGs presented a 65% (56 to 73%) overall survival at 5 years (log-rank $P = 0.002$). The hazard ratio for death was 0.62 [95% confidence interval (95%CI), 0.46 to 0.84] for patients treated with CGs. DIG was efficient in ameliorating the overall survival of patients treated with chemotherapy alone but not of those treated with radiotherapy alone (fig. S7). Moreover, DIG had a significant positive impact on the overall survival of patients with breast, colorectal, head and neck, and hepatocellular cancers, yet failed to improve the overall survival of lung and prostate cancer patients (Fig. 7C and figs. S8 to S10). Further subgroup analyses revealed that DIG failed to affect the overall survival of patients who received chemotherapy with immunogenic agents, namely, anthracyclines for breast cancer and oxaliplatin for colorectal cancer. In contrast, DIG had a significant positive impact on patients who received treatment with agents other than anthracyclines or oxaliplatin (Fig. 7, D and E). Together, these results suggest that DIG can ameliorate the efficacy of nonimmunogenic anticancer therapies.

DISCUSSION

The present study describes a fluorescent biosensor-based platform for the identification of ICD inducers. Three major hallmarks of ICD (CRT exposure, ATP secretion, and HMGB1 release) were measured by robotized fluorescence microscopy coupled to automated image analysis on cancer cells expressing appropriate biosensors, using a setup that is suitable for high-content, medium-throughput screening and that can be scaled up for high-throughput purposes.

Using a collection of FDA-approved and experimental drugs, we identified CGs as candidate ICD inducers and then validated their capacity to induce ICD in preclinical models and in clinical settings, hence providing a proof of principle of the approach.

Although the initial discovery and pharmacological development of CGs are unrelated to oncology, several investigators have advocated the use of CGs for the treatment of cancer (29, 30). Thus, CGs can effectively reduce the growth of xenografted human cancer cells in mice (30–32), a finding that, however, has been criticized because CGs have a higher affinity for the human Na^+, K^+ -ATPase than for its murine equivalent (26). Nonetheless, it has been reported that, as opposed to normal cells, human cancer cells express a combination of Na^+, K^+ -ATPase subunits that has a particularly high affinity for CGs, rendering them selectively susceptible to CG cytotoxicity (29). CGs are widely used in the general population, in particular, elderly patients (28), and several clinical studies have suggested that CGs may affect the clinical course of cancer. Thus, long-term use of CGs can increase the incidence of breast cancer (33) and reduce that of prostate cancer (33), perhaps because CGs are weak agonists of estrogen receptors.

Here, we provide evidence that clinically used CGs such as DIG and DIGT can stimulate ICD in vitro through their inhibitory effect on Na^+, K^+ -ATPase and consequent Ca^{2+} influx through the plasma membrane, in line with the documented proapoptotic and proimmunogenic effects of raised cytoplasmic Ca^{2+} levels (14, 34). According to one recent study, CGs can inhibit the ATPase activity of the pattern recognition receptor RIG-1 (retinoic acid-inducible gene 1), a sensor of viral RNA, thus reducing IFN- β expression, and may inhibit tumor necrosis factor (TNF) signaling, at least in part by interfering with the nuclear translocation of the transcription factor NF- κ B (nuclear factor κ B) (27). These anti-inflammatory effects are likely not to affect the anticancer immune responses, because neither the knockout of the common receptor for class 1 IFNs nor that of TNF has a major negative impact on the antitumor effects of anthracyclines in mice (7). Moreover, it appears plausible that the doses of CGs that are effective in human cancer cells (29, 30) are lower than those that mediate anti-inflammatory outcomes in normal cells of the immune system.

The clinical data supporting a positive impact of CGs on the outcome of some chemotherapeutic regimens have been obtained by retrospective analyses of patient cohorts who received CGs in one single hospital. Although this design facilitated the identification of matched controls (who shared biological and clinical parameters and were treated by the same department in the same period), it requires further validation. Prospective analyses must confirm that the administration of CGs along with chemotherapy ameliorates overall survival in cancer patients within the disease categories identified in this paper. We surmise that prospective clinical trials would have high chances to unravel beneficial effects for CGs in patients with locally advanced head and neck cancer who are treated with CDDP (which does not induce ICD on its own).

The fluorescent biosensor-based platform that we describe here has multiple potential applications. First, it can be used in its present setup to screen other drug collections. Thus far, we have only investigated a limited collection of agents, among which about 200 had a clear cytotoxic effect on the cells used in this screen, namely, human U2OS osteosarcoma cells. Results from previous functional screens suggest that only a minority (namely, 4 of 28 tested) of cytotoxic agents can stimulate ICD (1, 2, 12), indicating that this is an exceptional event that differs from nonimmunogenic apoptotic death because it occurs in normal development and adult tissue homeostasis. In accord with this

concept, we observed that most apoptotic inducers used in this screen failed to concomitantly stimulate all the hallmarks of ICD. It will be interesting to determine the ICD-inducing capacity of large collections of cytotoxic agents to identify new drugs that elicit an immunological bystander effect. Moreover, in the pipeline of drug discovery, it might be advisable to decide on the clinical development of compounds that share target and mechanism of action based on their (perhaps differential) ICD-stimulatory capacity.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

www.sciencetranslationalmedicine.org/cgi/content/full/4/143/143ra99/DC1

Materials and Methods

Fig. S1. Cardiac glycosides induce Hsp90 exposure.

Fig. S2. ER stress induction by cardiac glycosides.

Fig. S3. Cardiac glycosides induce CRT exposure.

Fig. S4. Human cells expressing murine Na^+, K^+ -ATPase subunit α_1 are less sensitive to cardiac glycosides.

Fig. S5. A role for calcium fluxes in cardiac glycoside-induced immunogenic cell death.

Fig. S6. T cell populations and cytokines involved in the digoxin-stimulated anticancer immune response.

Fig. S7. Comparison of digoxin effects on the survival of cancer patients treated with chemotherapy alone or radiotherapy alone.

Fig. S8. Effect of digoxin on the survival of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) or prostate cancer.

Fig. S9. Effect of digoxin on the survival of patients with breast cancer or colorectal cancer (CRC).

Fig. S10. Effect of digoxin on the survival of patients with head and neck cancer or hepatocellular cancer.

Table S1. Drug screen identifies cardiac glycosides as immunogenic cell death inducers.

Table S2. RNA interference arrays identify overlapping signaling pathways toward immunogenic cell death.

REFERENCES AND NOTES

1. N. Casares, M. O. Pequignot, A. Tesniere, F. Ghiringhelli, S. Roux, N. Chaput, E. Schmitt, A. Hamai, S. Hervas-Stubbs, M. Obeid, F. Coutant, D. Métyvier, E. Pichard, P. Aucouturier, G. Pierron, C. Garrido, L. Zitvogel, G. Kroemer, Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J. Exp. Med.* **202**, 1691–1701 (2005).
2. M. Obeid, A. Tesniere, F. Ghiringhelli, G. M. Fimia, L. Apetoh, J. L. Perfettini, M. Castedo, G. Mignot, T. Panaretakis, N. Casares, D. Métyvier, N. Larochette, P. van Endert, F. Ciccocanti, M. Piacentini, L. Zitvogel, G. Kroemer, Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* **13**, 54–61 (2007).
3. S. R. Mattarollo, S. Loi, H. Duret, Y. Ma, L. Zitvogel, M. J. Smyth, Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors. *Cancer Res.* **71**, 4809–4820 (2011).
4. I. Ray-Coquard, C. Cropet, M. Van Glabbeke, C. Sebban, A. Le Cesne, I. Judson, O. Tredan, J. Verweij, P. Biron, I. Labidi, J. P. Guastalla, T. Bachelot, D. Perol, S. Chabaud, P. C. Hogendoorn, P. Cassier, A. Dufresne, J. Y. Blay; European Organization for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group, Lymphopenia as a prognostic factor for overall survival in advanced carcinomas, sarcomas, and lymphomas. *Cancer Res.* **69**, 5383–5391 (2009).
5. L. Zitvogel, O. Kepp, G. Kroemer, Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **8**, 151–160 (2011).
6. W. J. Lesterhuis, J. B. Haanen, C. J. Punt, Cancer immunotherapy—Revisited. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 591–600 (2011).
7. F. Ghiringhelli, L. Apetoh, A. Tesniere, L. Aymeric, Y. Ma, C. Ortiz, K. Vermaelen, T. Panaretakis, G. Mignot, E. Ullrich, J. L. Perfettini, F. Schlemmer, E. Tasdemir, M. Uhl, P. Génin, A. Civas, B. Ryffel, J. Kanellopoulos, J. Tschopp, F. André, R. Lidereau, N. M. McLaughlin, N. M. Haynes, M. J. Smyth, G. Kroemer, L. Zitvogel, Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat. Med.* **15**, 1170–1178 (2009).
8. R. Zappasodi, S. M. Pupa, G. C. Ghedini, I. Bongarzone, M. Magni, A. D. Cabras, M. P. Colombo, C. Carlo-Stella, A. M. Gianni, M. Di Nicola, Improved clinical outcome in indolent B-cell lymphoma patients vaccinated with autologous tumor cells experiencing immunogenic death. *Cancer Res.* **70**, 9062–9072 (2010).
9. J. Fucikova, P. Kralikova, A. Fialova, T. Brtnicky, L. Rob, J. Bartunkova, R. Spisek, Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. *Cancer Res.* **71**, 4821–4833 (2011).

10. M. Michaud, I. Martins, A. Q. Sukkurwala, S. Adjemian, Y. Ma, P. Pellegatti, S. Shen, O. Kepp, M. Scoazec, G. Mignot, S. Rello-Varona, M. Tailler, L. Menger, E. Vacchelli, L. Galluzzi, F. Ghiringhelli, F. di Virgilio, L. Zitvogel, G. Kroemer, Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* **334**, 1573–1577 (2011).
11. L. Apetoh, F. Ghiringhelli, A. Tesniere, M. Obeid, C. Ortiz, A. Criollo, G. Mignot, M. C. Maiuri, E. Ullrich, P. Saulnier, H. Yang, S. Amigorena, B. Ryffel, F. J. Barrat, P. Saftig, F. Levi, R. Lidereau, C. Nogues, J. P. Mira, A. Chompret, V. Joulin, F. Clavel-Chapelon, J. Bourhis, F. André, S. Delaloge, T. Tursz, G. Kroemer, L. Zitvogel, Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.* **13**, 1050–1059 (2007).
12. A. Tesniere, F. Schlemmer, V. Boige, O. Kepp, I. Martins, F. Ghiringhelli, L. Aymeric, M. Michaud, L. Apetoh, J. Barault, J. Mendiboune, J. P. Pignon, V. Jooste, P. van Ender, M. Ducreux, L. Zitvogel, F. Piard, G. Kroemer, Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* **29**, 482–491 (2010).
13. T. Panaretakis, O. Kepp, U. Brockmeier, A. Tesniere, A. C. Bjorklund, D. C. Chapman, M. Durchschlag, N. Joza, G. Pierron, P. van Ender, J. Yuan, L. Zitvogel, F. Madeo, D. B. Williams, G. Kroemer, Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J.* **28**, 578–590 (2009).
14. I. Martins, O. Kepp, F. Schlemmer, S. Adjemian, M. Tailler, S. Shen, M. Michaud, L. Menger, A. Gdoura, N. Tajeddine, A. Tesniere, L. Zitvogel, G. Kroemer, Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress. *Oncogene* **30**, 1147–1158 (2011).
15. T. A. Ferguson, J. Choi, D. R. Green, Armed response: How dying cells influence T-cell functions. *Immunol. Rev.* **241**, 77–88 (2011).
16. T. Panaretakis, N. Joza, N. Modjtahedi, A. Tesniere, I. Vitale, M. Durchschlag, G. M. Fimia, O. Kepp, M. Piacentini, K. U. Froehlich, P. van Ender, L. Zitvogel, F. Madeo, G. Kroemer, The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell Death Differ.* **15**, 1499–1509 (2008).
17. C. E. Sorensen, I. Novak, Visualization of ATP release in pancreatic acini in response to cholinergic stimulus. Use of fluorescent probes and confocal microscopy. *J. Biol. Chem.* **276**, 32925–32932 (2001).
18. H. Imamura, K. P. Nhat, H. Togawa, K. Saito, R. Iino, Y. Kato-Yamada, T. Nagai, H. Noji, Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 15651–15656 (2009).
19. D. J. Klionsky, Autophagy in mammalian systems, Part B. Preface. *Methods Enzymol.* **452**, xxi–xxii (2009).
20. D. Ditsworth, W. X. Zong, C. B. Thompson, Activation of poly(ADP)-ribose polymerase (PARP-1) induces release of the pro-inflammatory mediator HMGB1 from the nucleus. *J. Biol. Chem.* **282**, 17845–17854 (2007).
21. L. Galluzzi, S. A. Aaronson, J. Abrams, E. S. Alnemri, D. W. Andrews, E. H. Baehrecke, N. G. Bazan, M. V. Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, D. E. Bredesen, C. Brenner, M. Castedo, J. A. Cidlowski, A. Ciechanover, G. M. Cohen, V. De Laurenzi, R. De Maria, M. Deshmukh, B. D. Dynlacht, W. S. El-Deiry, R. A. Flavell, S. Fulda, C. Garrido, P. Golstein, M.-L. Gougeon, D. R. Green, H. Gronemeyer, G. Hajnóczky, J. M. Hardwick, M. O. Hengartner, H. Ichijo, M. Jäättelä, O. Kepp, A. Kimchi, D. J. Klionsky, R. A. Knight, S. Kornbluth, S. Kumar, B. Levine, S. A. Lipton, E. Lugli, F. Madeo, W. Malorni, J.-C. W. Marine, S. J. Martin, J. P. Medema, P. Mehlen, G. Melino, U. M. Moll, E. Morselli, S. Nagata, D. W. Nicholson, P. Nicotera, G. Nuñez, M. Oren, J. Penninger, S. Pervaiz, M. E. Peter, M. Piacentini, J. H. M. Prehn, H. Puthalakath, G. A. Rabinovich, R. Rizzuto, C. M. P. Rodrigues, D. C. Rubinsztein, T. Rudel, L. Scorrano, H.-U. Simon, H. Steller, J. Tschopp, Y. Tsujimoto, P. Vandenabeele, I. Vitale, K. H. Vousden, R. J. Youle, J. Yuan, B. Zhivotovskiy, G. Kroemer, Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ.* **16**, 1093–1107 (2009).
22. R. Spisek, A. Charalambous, A. Mazumder, D. H. Vesole, S. Jagannath, M. V. Dhodapkar, Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: Therapeutic implications. *Blood* **109**, 4839–4845 (2007).
23. H. Tanaka, H. Matsushima, N. Mizumoto, A. Takashima, Classification of chemotherapeutic agents based on their differential in vitro effects on dendritic cells. *Cancer Res.* **69**, 6978–6986 (2009).
24. H. Tanaka, H. Matsushima, A. Nishibu, B. E. Clausen, A. Takashima, Dual therapeutic efficacy of vinblastine as a unique chemotherapeutic agent capable of inducing dendritic cell maturation. *Cancer Res.* **69**, 6987–6994 (2009).
25. T. W. Smith, Digitalis—Mechanisms of action and clinical use. *N. Engl. J. Med.* **318**, 358–365 (1988).
26. A. Perne, M. K. Muellner, M. Steinrueck, N. Craig-Mueller, J. Mayerhofer, I. Schwarzwinger, M. Sloane, I. Z. Uras, G. Hoermann, S. M. Nijman, M. Mayerhofer, Cardiac glycosides induce cell death in human cells by inhibiting general protein synthesis. *PLoS One* **4**, e8292 (2009).
27. J. Ye, S. Chen, T. Maniatis, Cardiac glycosides are potent inhibitors of interferon- β gene expression. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 25–33 (2011).
28. J. J. McMurray, M. A. Pfeffer, Heart failure. *Lancet* **365**, 1877–1889 (2005).
29. T. Mijatovic, E. Van Quaquebeke, B. Delest, O. Debeir, F. Darro, R. Kiss, Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **1776**, 32–57 (2007).
30. R. A. Newman, P. Yang, A. D. Pawlus, K. I. Block, Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. *Mol. Interv.* **8**, 36–49 (2008).
31. H. Zhang, D. Z. Qian, Y. S. Tan, K. Lee, P. Gao, Y. R. Ren, S. Rey, H. Hammers, D. Chang, R. Pili, C. V. Dang, J. O. Liu, G. L. Semenza, Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1 α synthesis and block tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 19579–19586 (2008).
32. I. Prassas, E. P. Diamandis, Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 926–935 (2008).
33. R. J. Biggar, J. Wohlfahrt, A. Oudin, T. Hjuler, M. Melbye, Digoxin use and the risk of breast cancer in women. *J. Clin. Oncol.* **29**, 2165–2170 (2011).
34. B. Zhivotovskiy, S. Orrenius, Calcium and cell death mechanisms: A perspective from the cell death community. *Cell Calcium* **50**, 211–221 (2011).

Acknowledgments: We acknowledge the gift of complementary DNAs encoding Na⁺,K⁺-ATPase from T. Maniatis. **Funding:** This work is supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipes labellisée), Agence Nationale pour la Recherche, European Commission (Active p53, Apo-Sys, ChemoRes, ApopTrain), China Scholarship Council, Fondation pour la Recherche Médicale, Institut National du Cancer, Cancéropôle Ile-de-France, Fondation Bettencourt-Schueller, and the LabEx Immuno-Oncology. **Author contributions:** L.M., E.V., S.A., I.M., Y.M., S.S., A.Q.S., T.Y., F.S., M.M., F.G., G.M., N.M., and O.K. performed experiments; L.M., E.V., S.A., I.M., C.L., F.A., and O.K. analyzed results and made the figures; E.S. and X.G. provided siRNA arrays; and L.M., L.G., L.Z., O.K., and G.K. designed the research and wrote the paper. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing financial interests. Y.M., L.Z., O.K., and G.K. hold a patent on “Compounds and uses thereof to induce immunogenic cancer cell death in a subject” (WO2010EP55404 20100422).

Submitted 2 February 2012

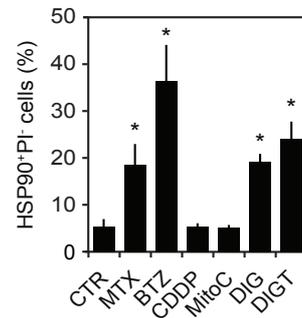
Accepted 22 May 2012

Published 18 July 2012

10.1126/scitranslmed.3003807

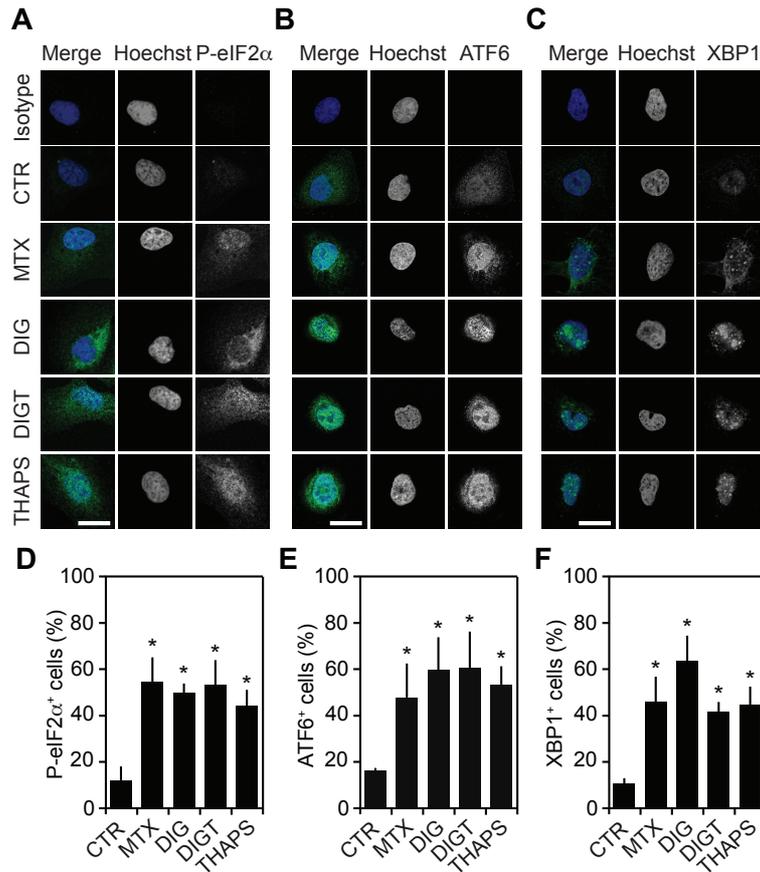
Citation: L. Menger, E. Vacchelli, S. Adjemian, I. Martins, Y. Ma, S. Shen, T. Yamazaki, A. Q. Sukkurwala, M. Michaud, G. Mignot, F. Schlemmer, E. Sulpice, C. Locher, X. Gidrol, F. Ghiringhelli, N. Modjtahedi, L. Galluzzi, F. André, L. Zitvogel, O. Kepp, G. Kroemer, Cardiac glycosides exert anticancer effects by inducing immunogenic cell death. *Sci. Transl. Med.* **4**, 143ra99 (2012).

Supplemental Display Items



Supplemental Figure 1

Figure S1. Cardiac glycosides induce HSP90 exposure. Human osteosarcoma U2OS cells were left untreated (CTR) or treated for 12 h with 1 μ M mitoxantrone (MTX), 1 μ M bortezomib (BTZ), 1 μ M digoxin (DIG), 1 μ M digitoxin (DIGT), 150 μ M cisplatin (CDDP) or 30 μ M mitomycin C (MitoC), followed by immunostaining for the detection of surface-exposed HSP90. Columns report the percentage of living cells (PI⁻) that exposed HSP90 on the cell surface (HSP90⁺) (means \pm SEM, n = 3, * = $p < 0.05$, two-tailed Student's t test, as compared to CTR cells).



Supplemental Figure 2

Figure S2. ER stress induction by cardiac glycosides. Human osteosarcoma U2OS cells were left untreated (CTR) or treated for 4 h with 1 μ M mitoxantrone (MTX), 1 μ M digoxin (DIG), 1 μ M digitoxin (DIGT), or 1 μ M thapsigargin (THAPS) as a positive control, followed by immunostaining for the detection of ER stress markers (eIF2a phosphorylation, translocation of ATF6 to the nucleus, XBP1 splicing). Representative images illustrating cytoplasmic eIF2 α phosphorylation (**A**), ATF6 nuclear translocation (**B**) and XBP1 splicing (**C**). In panels **D-F**, quantitative data are reported (means \pm SEM, $n = 3$, * = $p < 0.05$, two-tailed Student's t test, as compared to CTR cells).

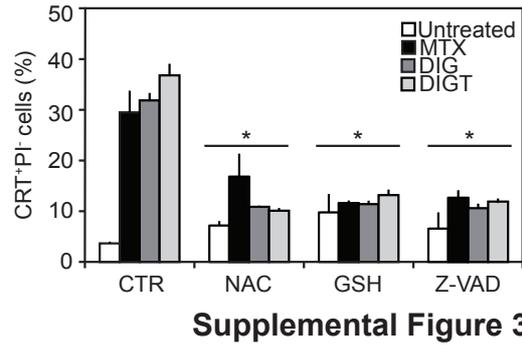
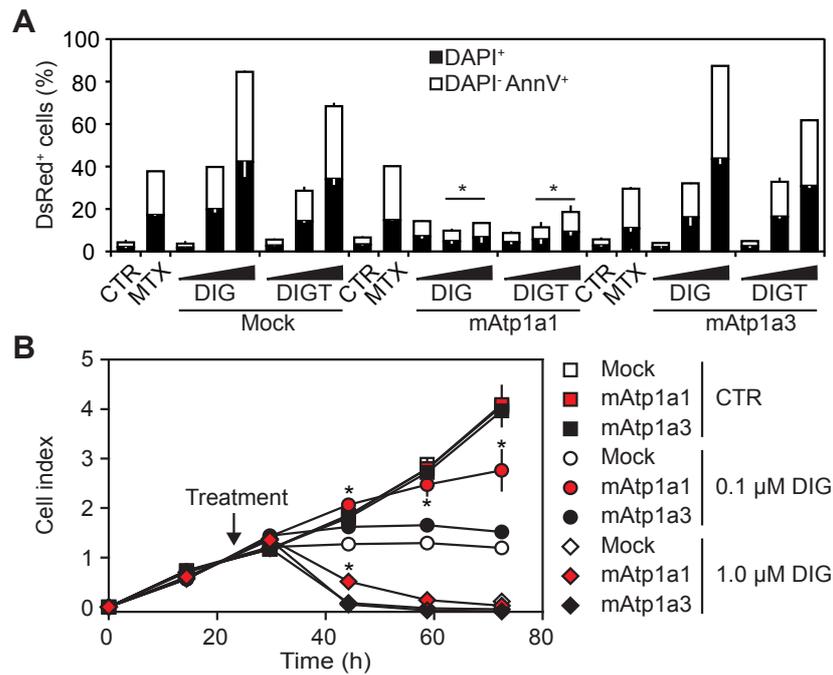


Figure S3. Cardiac glycosides induce CRT exposure. Human osteosarcoma U2OS cells were left untreated (CTR) or pre-incubated for 30 min with 5 mM *N*-Acetyl-l-cysteine (NAC), 5 mM reduced *L*-glutathione (GSH), or for 2 h with 150 μ M benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe)-fluoromethylketone (Z-VAD) and then treated with 1 μ M digoxin (DIG), digitoxin (DIGT) or mitoxantrone (MTX) for 4 h, followed by cytofluorometry for the assessment of calreticulin (CRT) exposure on the cell surface. Columns report the % of living cells (PI⁻) that exposed CRT on the cell surface (CRT⁺) (means \pm SEM, n = 3, * = $p < 0.05$, two-tailed Student's *t* test, as compared to CTR cells).



Supplemental Figure 4

Figure S4. Human cells expressing murine Na^+/K^+ ATPase subunit $\alpha 1$ are less sensitive to cardiac glycosides. (A) Human osteosarcoma U2OS cells stably co-expressing the DsRed fluorescent protein and the murine Na^+/K^+ ATPase subunits $\alpha 1$ (mAtp1a1) or $\alpha 3$ (mAtp1a3) were kept in control conditions or treated with $1 \mu\text{M}$ mitoxantrone (MTX) or with 0.1 , 1 or $10 \mu\text{M}$ digoxin (DIG) or digitoxin (DIGT) for 24 h. Thereafter, cells were co-stained with AnnexinV-FITC and DAPI and cell death was monitored by cytofluorometry. White and black columns report the % of dying ($\text{DAPI}^-\text{AnnV}^+$) and dead (DAPI^+) cells, respectively (means \pm SEM, $n = 3$, $* = p < 0.05$, two-tailed Student's t test, as compared to CTR cells). (B) Wild-type U2OS cells transfected as in A were plated on microelectrode-coated plates, allowed to adhere for 24 h, and then treated with the indicated concentration of digoxin (DIG). Thereafter, the cell index, an indirect measure of cell morphology and adherence, was monitored every 15 min for the following 2 days by means of a xCELLigence analyzer. Data are presented as means \pm SEM ($n = 3$, $* = p < 0.05$, two-tailed Student's t test, as compared to mock-transfected cells treated with the same concentration of DIG).

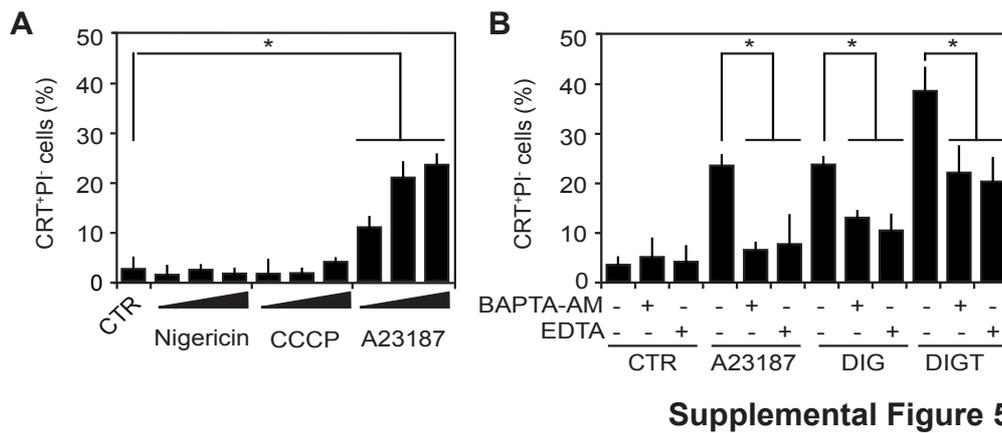
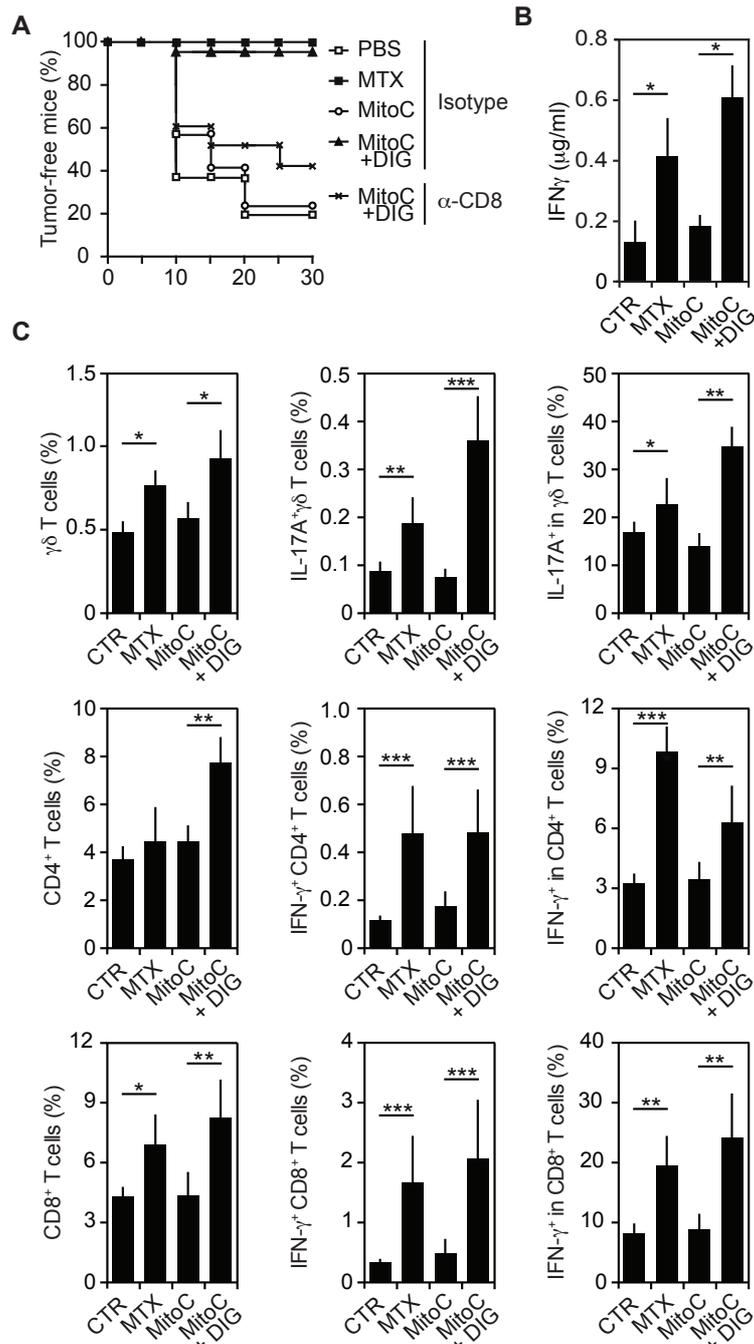


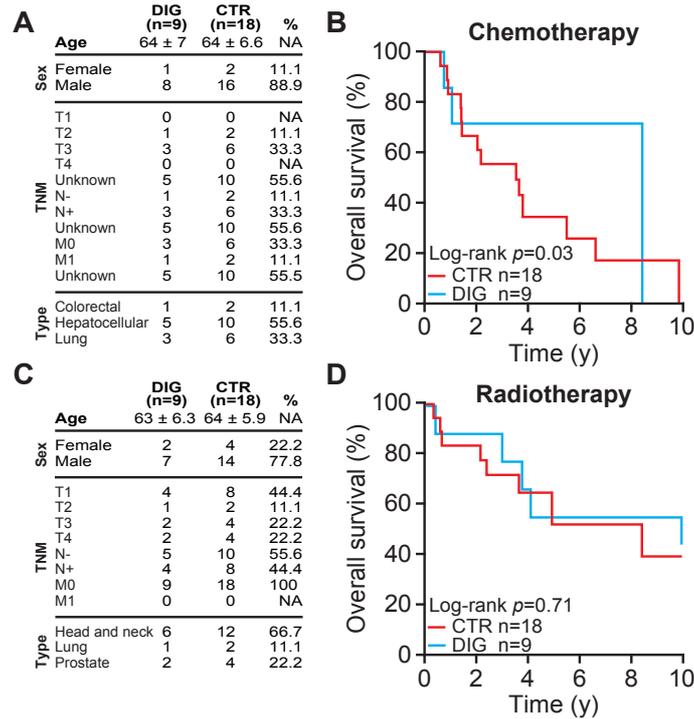
Figure S5. A role for calcium fluxes in cardiac-glycosides-induced immunogenic cell death. (A) Wild-type human osteosarcoma U2OS cells were treated with 1.25, 2.5 or 5 μM nigericin (a K⁺ ionophore), CCCP (a protonophore) or A23187 (a Ca²⁺ ionophore) for 4 h, followed by immunostaining for the cytofluorometric detection of calreticulin (CRT) surface exposure. (B) Wild-type U2OS cells were treated for 4 h with 5 μM A23187, 1 μM digoxin (DIG) or 1 μM digitoxin (DIGT), either alone or in combination with 10 μM BAPTA-AM (an extracellular Ca²⁺ chelator) or 1 mM EDTA (an intracellular Ca²⁺ chelator). CRT exposure was subsequently assessed by immunostaining and FACS analysis. In A and B, columns report the % of living cells (PI⁻) that exposed CRT on the cell surface (CRT⁺) (means ± SEM, n = 3, * = *p* < 0.05, two-tailed Student's *t* test).



Supplemental Figure 6

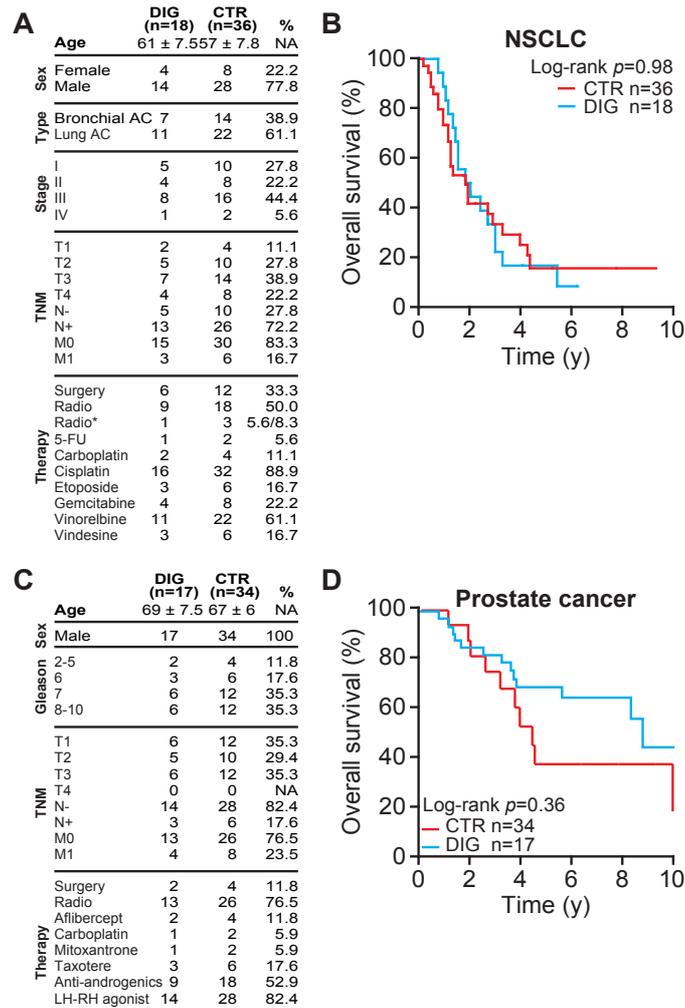
Figure S6. T cell populations and cytokines involved in the digoxin-stimulated anticancer immune response. (A) Contribution of CD8 $^+$ T cells to the anticancer immune response stimulated by the co-administration of mitomycin C (MitoC) and digoxin (DIG) or mitoxantrone (MTX). MCA205 fibrosarcoma cells were treated *in vitro* with 1 μ M MTX, or 200 μ M MitoC, alone or combined with 20 μ M DIG, and then subcutaneously injected into

the left flank of C57BL/6 mice. Seven days later, mice were injected with live MCA205 cells into the opposite flank (day 0) and were routinely monitored for tumor incidence. In addition, mice received periodic injections of an isotype control antibody or a CD8 α -specific antibody starting on day -2. ($n=10$ mice per each group) **(B)** Effect of digoxin treatment on DCs activation. MCA205 fibrosarcoma cells were injected into the thighs of C57BL/6 mice. When tumors reached about about 50 mm² in size, the mice were treated intraperitoneally with PBS, 5 mg/Kg MTX, 0.33 mg/Kg MitoC or 0.33 mg/Kg MitoC + DIG 2.5 mg/Kg. Four days after chemotherapy injection, tumor draining inguinal lymph nodes were collected, and cells were submitted to *in vitro* re-stimulation for 3 days, followed by the quantification of IFN γ into the cell supernatant by ELISA (means \pm SEM, $n = 3$, * = $p < 0.05$, two-tailed Student's *t* test, as compared to CTR cells). **(C)** Impact of digoxin on tumor infiltration by T cell subpopulations. C57BL/6 mice with palpable MCA205 fibrosarcomas received PBS (CTR) or systemic chemotherapy consisting in 2.5 mg/Kg DIG, 0.33 mg/Kg MitoC or 5 mg/Kg MTX, as indicated. Seven days later, tumors were dissociated and different T cell subpopulations, as defined by the cell surface expression of CD4, CD8a and γ/δ TCR as well as by the intracellular expression of IFN γ and IL-17A, were quantified by immunofluorescence staining and cytofluorometric analysis (means \pm SEM, $n = 7$ tumors per treatment group, * = $p < 0.05$, two-tailed Student's *t* test).



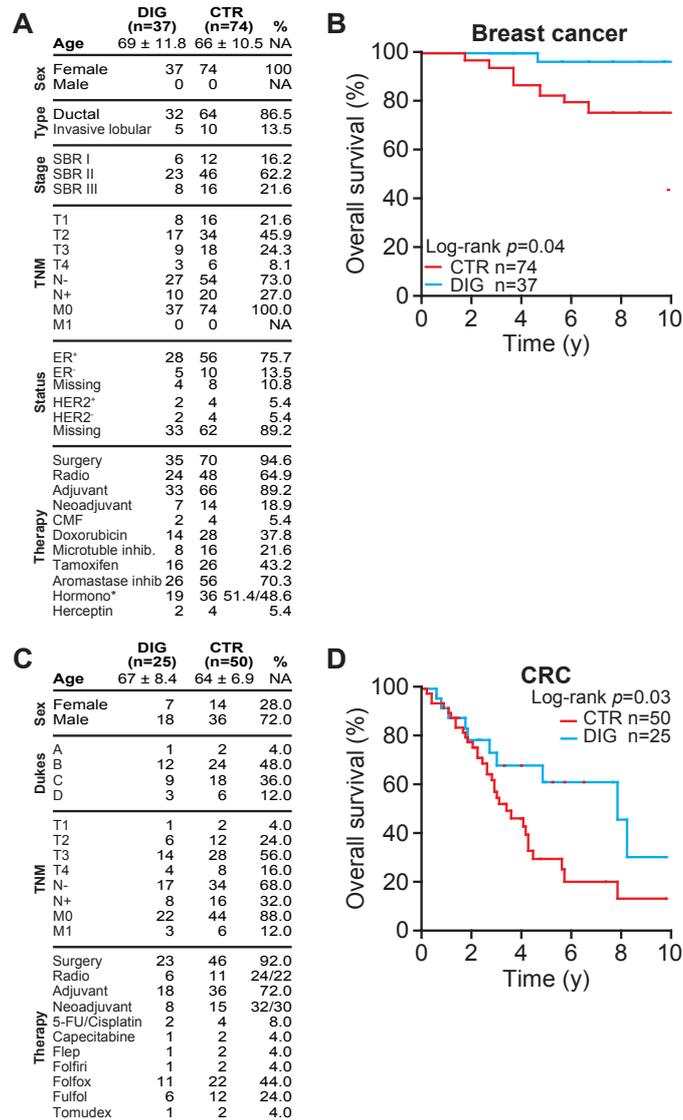
Supplemental Figure 7

Figure S7. Comparison of digoxin effects on the survival of cancer patients treated with chemotherapy alone or radiotherapy alone. Among the patient cohort represented in **Fig. 7A**, patients who received chemotherapy alone (without radiotherapy, hormonotherapy or surgery) (**A**) were analyzed for overall survival according to their status of digoxin (DIG) receivers (**B**). Similarly, the overall survival patients who received radiotherapy alone (without chemotherapy, hormonotherapy or surgery) was analyzed according to their status of DIG receivers (**C,D**).



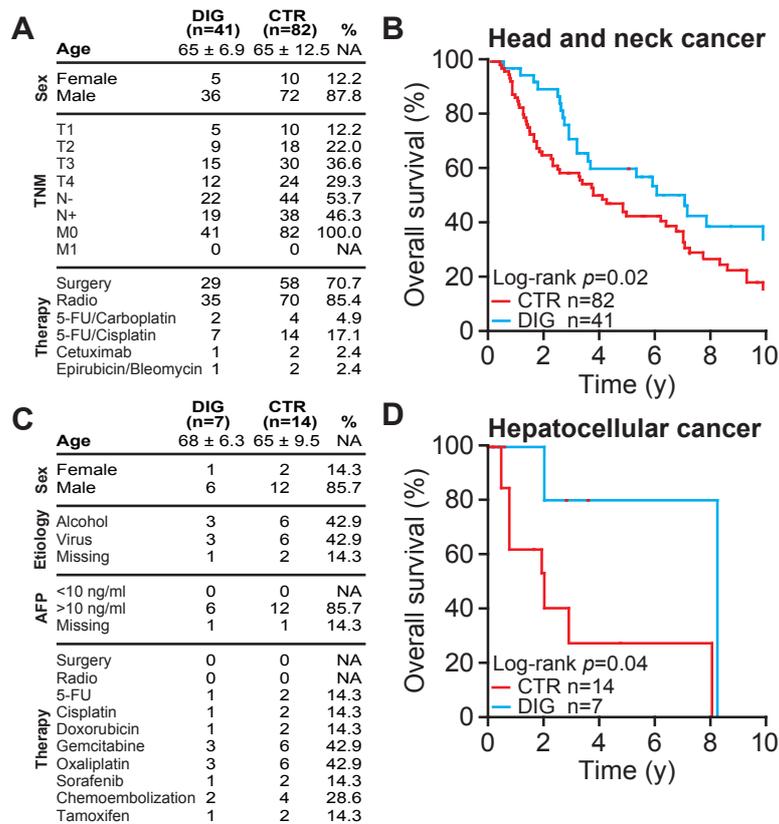
Supplemental Figure 8

Figure S8. Effect of digoxin on the survival of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) or prostate cancer. Among the patient cohort represented in **Fig. 7A**, NSCLC (**A**) and prostate cancer patients (**B**) were selected for subgroup analysis of overall survival according to their status of digoxin (DIG) receivers (**C,D**). *p* values (Log-rank test) are reported. Please note that DIG-treated and untreated (CTR) patients were individually case matched. (AC, adenocarcinoma; *, exclusively radiotherapy)



Supplemental Figure 9

Figure S9. Effect of digoxin on the survival of patients with breast cancer or colorectal cancer (CRC). Among the patient cohort represented in **Fig. 7A**, patients with breast (**A**) and colorectal cancer (**B**) were selected for subgroup analysis of overall survival according to their status of digoxin (DIG) receivers (**C,D**). *p* values (Log-rank test) are reported. Please note that DIG-treated and untreated (CTR) patients were individually case matched. (*exclusively hormonotherapy)



Supplemental Figure 10

Figure S10. Effect of digoxin on the survival of patients with head and neck cancer or hepatocellular cancer. Among the patient cohort represented in **Fig. 7A**, patients with head and neck (**A**) and hepatocellular cancer (**B**) were selected for subgroup analysis of overall survival according to their status of digoxin (DIG) receivers (**C,D**). p values (Log-rank test) are reported. Please note that DIG-treated and untreated (CTR) patients were individually case matched.

DISCUSSION

La plateforme de microscopie à fluorescence que nous avons utilisé présente de multiples applications potentielles et son utilisation pourrait être optimisée par le criblage d'autres bibliothèques de composés. Dans cette étude, nous n'avons testé que 1160 molécules, dont 200 seulement possédaient un réel potentiel cytotoxique pour les cellules d'ostéosarcomes humains U2OS. Les précédents criblages, ceux qui ont permis d'identifier les premiers inducteurs de la MCI ont révélé que seule une petite fraction des agents cytotoxiques (4 sur 28) [155] [232] [202] était capable de stimuler cet évènement apoptotique exceptionnel, différent de la mort apoptotique non immunogène intervenant dans le développement et l'homéostasie des tissus adultes. Cette étude basée sur la fluorescence des biosenseurs a donc permis l'identification des GCs comme nouveaux inducteurs de la MCI, de part leur stimulation de trois caractéristiques majeures, la cotranslocation de CRT/ERp57 à la membrane, la sécrétion d'ATP et le relargage d'HMGB1. Nous avons en outre démontré leur capacité d'induction d'une MCI dans des modèles précliniques et dans un contexte clinique, fournissant ainsi une preuve de principe de l'approche utilisée.

Le paradigme de la découverte d'une nouvelle application clinique pour des composés actifs très anciens s'applique précisément aux glucosides cardiotoniques. Ils sont utilisés depuis 1500 avant JC par diverses cultures comme émétiques, diurétiques, toniques cardiaques et poisons de flèches [258] [259]. A priori sans rapport avec l'oncologie, ils ont cependant fait l'objet de plusieurs études révélant leur intérêt dans le traitement du cancer [260] [261]. De nos jours, ces molécules naturelles servent à augmenter la contractibilité cardiaque des patients atteints d'arythmie et d'insuffisance cardiaque congestive [262]. Chimiquement, ils sont composés d'un noyau stérane possédant une partie lactone en position 17 et des résidus glycosides (L-rhamnose, D-glucose, D-digitoxose, D-digitalose, D-diginose, D-sarmentose, L-vallarose and D-fructose) en position 3 [260]. En fonction du résidu lactone, ils sont classés en deux catégories. Les cardénolides possèdent un anneau butyrolactone insaturé et sont retrouvés dans diverses plantes comme la *Strophanthus* (ouabaïne), les *Digitalis lanata* et *Digitalis purpurea* (digoxine, digitoxine), la *Scilla maritima* (proscillaridine A), le *Nerium oleander* (oléandrine, oléandrigénine). Les bufadiénolides, présents quant à eux, chez les grenouilles *Bufo Rubescens* et *Bufo marinus* (marinobufagénine) possèdent un anneau α -pyrone [263]. Le mécanisme d'action des GCs ne fût découvert qu'il y a une cinquantaine d'années, lorsque Schatzmann et son équipe ont identifié leur capacité d'inhibition spécifique de la pompe Na^+/K^+ -ATPase1 (EC 3.6.3.9). L'ATPase est une protéine membranaire ubiquitaire qui utilise l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour conduire le transport actif des ions K^+ dans la cellule et des ions

Na⁺ hors de la cellule. L'inhibition de la pompe entraîne l'augmentation du niveau d'ions Na⁺ dans le cytoplasme ce qui active l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ et augmente la [Ca²⁺]_i [264] [257]. Nous avons précédemment fourni la preuve que deux GCs utilisés en clinique, la DIG et la DIGT pouvaient stimuler une MCI *in vitro* par inhibition de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase et induction d'un influx calcique, ce qui est en accord avec les effets proimmunogènes et proapoptotiques des niveaux de Ca²⁺ cytoplasmiques élevés [265] [266] [267]. La production de ROS s'avère être également un paramètre important pour induire la MCI puisqu'en présence d'antioxydants, l'exposition de la CRT est inhibée [190]. Nous avons également mis en évidence une inhibition de l'exposition de la CRT et de la sécrétion d'ATP en présence de NAC ou de GSH, en réponse à la DIG ou à la DIGT. De manière surprenante, ces antioxydants ou encore l'inhibiteur des caspases, Z-VADfmk n'ont eu aucun effet sur le relargage d'HMGB1 induit par les CGs, contrairement à ce qui a été observé en présence de MTX. Ainsi, certains mécanismes d'induction de la MCI semblent être différents pour les GCs. Concernant le reste de la signalisation, une activation du stress du RE *premortem* a été observée après traitement des cellules par la DIG, la DIGT ou la MTX. Cependant, les expériences d'immunohistochimie sur les cellules U2OS ne nous ont pas permis de discriminer laquelle des trois voies de signalisation de stress du RE est majoritairement stimulée en réponse aux GCs. Il serait donc intéressant d'évaluer si comme pour la MTX, la suppression d'ATF6 *Activating transcription factor 6* (avec un siRNA) ou de IRE1 *ER-resident transmembrane kinase-endoribonuclease inositol-requiring enzyme 1* (par inactivation du gène) n'a pas d'action sur l'exposition de la CRT [190].

Pour le module apoptotique, il a été démontré dans la littérature que les GCs pouvaient activer une signalisation apoptotique intrinsèque (ou mitochondriale) par un relargage du cytochrome C et une perte du potentiel de membrane mitochondrial (MMP) dans des lignées de LAM [268], dans la lignée de cancer de la vessie T24 [269] ou dans les cellules Hela [270]. Toutefois, en réponse à la MTX, l'exposition de la CRT semble indépendante de l'apoptose associée à la perte de MMP dans les cellules Hela. Il faut cependant rappeler que l'exposition de la CRT est un événement précoce, non concomitant à la perte de MMP et au relargage de cytochrome C. En outre, une activation de la caspase 8, ainsi qu'un recrutement des protéines pro-apoptotiques Bak et Bax ont été induits dans des lignées leucémiques humaines par l'UNBS1450, un dérivé des cardélonides [271]. Ces résultats ont été corroborés par le criblage des siRNA impliqués dans les signalisations de mort cellulaire induite par la DIG. Pour résumer, des effets pro-apoptotiques des GCs ont été repertoriés dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, incluant le sein [272] [273] [274], la prostate [275] [276]

[277], le mélanome [278], le pancréas [279], le poumon [280] [281], les cellules leucémiques [268], les neuroblastomes [282], d'adénocarcinomes rénaux [274] et les glioblastomes (à noter que les GCs traversent la barrière hémato-encéphalique) [283] [284]. Au vu des ces résultats et afin d'éliminer une possible action spécifique du type cellulaire U2OS, nous avons mesuré les caractéristiques de la MCI en réponse aux GCs par des méthodes alternatives à l'utilisation de la plateforme dans sept lignées cellulaires cancéreuses humaines différentes.

De récentes expériences ont montré qu'un autre type de mort cellulaire, la nécroptose (mort cellulaire non apoptotique, induite par la fixation des ligands TNF- α , TRAIL et FasL, activant les RIPK *receptor-interacting protein kinase*) pouvait intervenir dans la régulation du système immunitaire. En effet, il a été montré que la nécroptose dépendante de RIPK3 des cellules hépatocytaires conduisait au relargage massif et prolongé de DAMPs dans la circulation sanguine et que cet événement constituait un facteur étiologique déterminant pour l'inflammation liée au choc septique [285]. Nous avons donc tenté d'élucider si des mécanismes similaires pouvaient être à l'origine de la MCI induite par les CGs. Ainsi, des expériences de cytométrie en flux ont révélées que la nécrostatine (inhibiteur des RIPK) n'avait aucun effet sur l'exposition de la CRT induite par la DIG, la DIGT ou la MTX.

Du fait de l'induction d'une cardiotoxicité importante, les CGs ont une fenêtre thérapeutique étroite, qui est de l'ordre du nanomolaire. Les effets bénéfiques cliniques de la DIG reposent donc sur des concentrations sériques inférieures à 1ng/mL, représentant environ 0,25mg par jour [286]. La plage de concentration plasmatique des patients traités est entre 20 et 33 nM pour la DIGT et entre 1 et 2,8 nM pour la DIG [274]. Ceci étant dû à une différence structurelle entre la DIG et la DIGT au niveau d'un groupement hydroxyl, ce qui change la pharmacodynamique et la pharmacocinétique de ces substances. Par conséquent, après avoir identifié leur potentiel d'induction de la MCI par criblage et aux concentrations de 1 μ M et 10 μ M, nous avons mesuré par des méthodes alternatives, les différents paramètres de la MCI. Il faut savoir que l'intoxication aux GCs peut entraîner d'autres effets secondaires comme des arythmies mais aussi des anomalies du système nerveux ou des problèmes gastro-intestinaux. Les cas de surdosages peuvent néanmoins être traités par l'administration d'antidotes à base de fragments Fab d'anticorps spécifiques de la DIG [287].

Une des caractéristiques les plus surprenante et intéressante des GCs est que les réponses des cellules cancéreuses aux GCs semblent être différentes de celles des cellules non malignes. En effet, dans divers types de cellules épithéliales, des études récentes soulignent un nouvel aspect de la biologie de la Na⁺ / K⁺-ATPase en tant que signalosome polyvalent (Src, EGFR, RAS, MAPK, PLC, PI3K) pouvant réguler divers processus cellulaires [288]

[289] [280] [275] [290]. En outre, l'étude pharmacodynamique de certains GCs comme la ouabaine a révélé qu'*in vitro*, à des concentrations comprises entre 1 et 50 μ M, ils pouvaient jouer un rôle dans l'attachement des cellules [291], l'expression des gènes CFTR/MDR-1 (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator / Multidrug resistance*) [292], l'orientation de la polarité [293], le trafic des protéines [294] et enfin la prolifération [295]; [296] [297] [298] des cellules normales comme les myocytes, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales [257]. En revanche, de nombreuses études comparatives mettent en évidence l'induction d'une cytotoxicité préférentielle, d'autophagie et d'un arrêt du cycle cellulaire des cellules tumorales pour des concentrations de GCs inférieures à 1 μ M [261] [275]. Il a été montré par exemple, que les GCs (bufadénolides) pouvaient induire une apoptose sélective des lymphoblastes T Jurkat dès 100nM alors qu'ils affectent très peu les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) jusqu'à 100 μ M [299]. De la même manière, l'oléandrine présente une cytotoxicité sélective pour les cellules malignes (Hela, DU145, PC3) mais pas pour les PBMC et les neutrophiles, à des concentrations identiques [290]. Mais encore, la sensibilisation aux radiations des cellules d'adénocarcinome pulmonaire A549 dès 4h de traitement par la ouabaine à 1 μ M n'est pas retrouvée pour les fibroblastes pulmonaires CCL-210, même traités à 10 μ M [300]. Dans une autre étude, pour exclure la possibilité que ces effets ne soient imputables à une plus importante prolifération des cellules, des cellules non malignes mais à forte prolifération (stimulation à l'IL-2) ont été utilisées comme contrôle. Il a été observé que les concentrations de GC (DIGT) qui inhibent la croissance et entraînent l'apoptose des cellules cancéreuses étaient inefficaces sur ces cellules non malignes [283]. Plusieurs publications suggèrent que ces effets seraient liée à l'expression différentielle de combinaisons de sous-unités de la pompe Na⁺/K⁺ATPase entraînant une affinité particulièrement élevée pour les GCs [260]. En effet, l'étude de douze lignées cellulaires tumorales a indiqué qu'une forte expression de la sous-unité α 1 en présence d'une faible expression de la sous-unité α 3 était corrélée a une augmentation de la résistance à la cytotoxicité des GCs [301]. La pompe Na⁺/K⁺ATPase est composée de deux sous unités en proportions équimolaires: la sous-unité catalytique α est une protéine transmembranaire contenant les sites d'interaction pour le Na⁺, le K⁺, l'ATP et les GCs et la sous-unité régulatrice β , transmembranaire elle aussi et possédant des sites de glycosylations nécessaires à l'activité enzymatique du complexe [260]. Chez la souris, la sous-unité α 1 est relativement insensible à l'inhibition par les GCs, cela vient d'une mutation dans deux acides aminés (Q111R et N122D) de la première région extracellulaire. Entre les rongeurs et

l'Homme, on note ainsi une insensibilité de l'ordre de 1000 fois supérieure [302]. Des expériences *in vivo* ont révélé que les GCs pouvaient diminuer la croissance de cellules cancéreuses humaines xéno greffées chez la souris [261] [257], cette constatation a été cependant critiquée en raison de cette plus forte affinité pour la pompe humaine que pour l'équivalent murin [256]. De ce fait, pour obtenir une mortalité des cellules murines MCA205 d'environ 70%, la concentration de DIG ou de DIGT nécessaire est d'environ 100µM. Toutefois, les concentrations optimales pour l'exposition de la CRT dans ces cellules sont 20µM pour la DIG ou 40µM pour la DIGT et en combinaison avec les chimiothérapies non immunogènes que sont la mitomycine C ou la cisplatine, une mortalité suffisante pour la vaccination tumorale fût obtenue. Concernant le traitement systémique par GCs utilisé pour les expériences de croissance ou d'infiltration tumorales, les différentes doses testées ont révélé qu'une concentration de DIG de 2,5mg/kg, correspondant à la demie dose létale, permettait d'obtenir un bénéfice thérapeutique significatif.

Quelques effets anti-inflammatoires en réponse aux GCs ont également été mis en évidence. Selon une étude récente, les CGs (bufaline) peuvent inhiber l'activité ATPase du récepteur RIG-1 (*retinoid-inducible gene 1*), un capteur de l'ARN viral, ce qui réduit l'expression d'interféron β , et peut inhiber la signalisation du TNF (*tumor necrosis factor*) en interférant en partie avec la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B [303]. Néanmoins ces effets ne sont pas susceptibles d'affecter les réponses immunitaires anticancéreuses car il a été montré que l'inactivation du gène codant pour le récepteur commun aux interférons de classe I ou la présence de TNF n'entraînent pas d'impact négatif majeur sur les effets antitumoraux des anthracyclines chez la souris [202]. Une autre étude a révélé que la DIG, à des concentrations non cytotoxiques pour les PBMC (<100nm) pouvait inhiber la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF-alpha, IL-6) [304]. Toutefois, il semble plausible que les doses de GCs induisant des propriétés anticancéreuses [257] soient inférieures à celles qui assurent la médiation anti-inflammatoire dans les cellules normales du système immunitaire. Dès lors, la réponse finale au traitement par les GCs dépend de la dose, de la durée d'exposition et du tissu concerné [260]. Quoiqu'il en soit, les effets pléiotropiques sélectifs des GCs sur les cellules cancéreuses justifient leur utilisation potentielle comme thérapie anticancéreuse, et la première génération de traitements du cancer basés sur leur utilisation est actuellement en essais cliniques [257].

Malgré le fait que les doses thérapeutiques des digitaliques soient dangereusement proches des doses létales, ils constituent encore les médicaments les plus efficaces, disponibles pour le traitement de l'insuffisance cardiaque causée par l'hypertension ou l'artériosclérose. A titre d'exemple, aux États-Unis environ 1,7 millions de patients ont été traités par la digoxine pour une insuffisance cardiaque et / ou une fibrillation auriculaire [305]. C'est pourquoi de nombreuses données épidémiologiques existent à propos des GCs et elles ont permis de réaliser de nombreuses études rétrospectives au cours de ce 20^{ème} siècle révélant des résultats surprenants : très peu de patients maintenus sous traitement par GCs pour des problèmes cardiaques sont décédés d'un cancer [306]. Ainsi, dans les années 1980, Stenkvist et ses collègues ont rapporté que les cellules de cancer du sein de patientes ayant reçues une thérapie à base de digitaliques comportaient des caractéristiques plus bénignes que celles des patientes contrôles [307] [308] [309]. De plus, cinq ans après une mastectomie, le taux de récurrence des patientes sous traitement à la DIG était 9,6 fois inférieur à celui des patientes sans digitalique [309]. À la même époque, une confirmation de ces résultats fut apportée par l'équipe de Goldin, qui a étudié les effets du traitement aux digitaliques chez 127 patients atteints de cancer. Sur les 21 morts attribuées au cancer, un patient seulement appartenait au groupe digitalique [309]. Toutefois, ces résultats encourageants ne déclenchèrent pas beaucoup d'attention à l'époque. Plus récemment, des données de 20 ans de suivi ont démontré que les patients ayant reçu des digitaliques présentaient une diminution du taux de mortalité (6%, 2/32) par rapport au groupe contrôle (34%, 48/143) [310]. Cependant, le faible nombre de patients de cette étude ne permet pas de conclusions solides concernant les effets de ces molécules dans le traitement du cancer. En réponse à ce besoin, Haux et son équipe ont conduit une analyse des effets anticancéreux du traitement par la DIGT d'une cohorte de 9 271 patients. Bien qu'aucun effet anticancéreux significatif ne fut mis en évidence, un lien entre de fortes concentrations plasmatiques de DIGT et un risque réduit d'apparition de leucémies et de cancers du tractus urinaire fût établi [311] [283] [257]. Enfin, très récemment, une étude du risque d'apparition de cancer de la prostate a été effectuée par le suivi de 1986 à 2006 de 47 884 patients. Elle a révélé que l'utilisation régulière de DIG diminuait de 25 % le risque d'apparition du cancer de la prostate par rapport aux patients non traités (risque relatif = 0.76; 95% IC 0.61–0.95), notamment après plus de 10 ans de traitement (risque relatif = 0.54; 95% IC, 0.37–0.79; $P < 0.00.1$) [312]. En revanche, une utilisation prolongée de CGs peut augmenter l'incidence de cancer du sein, peut-être dû au fait que les GCs sont des agonistes des récepteurs aux oestrogènes [313]. Finalement, concernant notre étude rétrospective, les données cliniques démontrant un impact positif des GCs sur les

résultats de certains schémas chimiothérapeutiques ont été obtenues par une analyse rétrospective de cohortes de patients issus d'un seul hôpital. Bien que ce modèle d'étude ait facilité l'identification des patients témoins appariés (partageant les paramètres biologiques et cliniques et traités par le même département, à la même période), il nécessite des validations plus approfondies. Des analyses prospectives pourraient confirmer que l'administration de GCs conjointement à la chimiothérapie améliore la survie globale chez les patients atteints de cancer pour les catégories identifiées dans cette étude.

Ces dernières années, un certain nombre d'essais cliniques ont été entrepris pour tester les effets bénéfiques des GCs dans le traitement de divers type de cancer. A ce jour, une seule étude est terminée. Il s'agissait d'évaluer l'effet de la combinaison d'Erlotinib (un inhibiteur sélectif de la tyrosine kinase du récepteur du facteur de croissance épidermique EGFR) et de la DIG dans un essai de phase II sur les cancers du poumon non à petites cellules NCT00281021. Néanmoins, sur les 26 participants, les analyses n'ont révélé qu'une réponse partielle chez un seul patient. Toutefois, d'autres études prospectives sont en cours, les résultats concernant l'examen des effets du Lapatinib (un autre inhibiteur de la tyrosine kinase de l'EGFR) sur la pharmacocinétique de la DIG dans les cancers du sein métastatiques ErbB2 positifs sont attendus NCT00650910. Un autre essai (phase I) concerne la pharmacocinétique et les interactions moléculaires entre le traitement par Tivantinib (un inhibiteur de la tyrosine kinase du récepteur de facteur de croissance des hépatocytes HGFR) et la DIG pour divers types de cancer NCT01517399. En outre, deux essais de phase I sont en cours concernant l'oléandrine (PBI-05204), une étude teste actuellement la combinaison d'oléandrine (Nerium Oleander), de carboplatine et de docetaxel dans le traitement des patients atteints de cancers du poumon non à petites cellules NCT01562301 et une étude recrute des candidats atteints de cancers avancés pour analyser l'effet de l'oléandrine seule NCT00554268. Egalement, une étude de phase II randomisée, en double aveugle et avec des contrôles placebo évalue l'impact des GCs (bufaline, cinobufagine et résibufogénine) contenus dans le Huachansu (un traitement de médecine chinoise provenant de la grenouille) et de la gemcitabine (antimétabolite analogue de la déoxycytidine) dans le traitement du cancer pancréatique. NCT00837239. Pour terminer, des patients sont en cours de recrutement pour une étude pilote de phase II testant l'impact d'un traitement à la DIG pour les récives de cancer de la prostate NCT01162135. Enfin, au vu des résultats apportés par notre étude rétrospective et des diverses validations précliniques, une étude de phase I réalisée à l'hôpital Européen Georges Pomidou, sur des patients atteints de cancer ORL localement avancé et traités à la CDDP ou à la CDDP+ DIG vient d'être entreprise. Les GCs font donc l'objet d'une investigation clinique

grandissante et nous espérons que tous ces essais prospectifs sur les effets de la DIG dans le traitement du cancer nous permettront à terme d'obtenir des bénéfices thérapeutiques. Enfin, il serait intéressant de développer la synthèse de dérivés des GCs ayant la capacité d'inhiber la prolifération ou d'induire une MCI des tumeurs humaines tout en réduisant la toxicité cardiaque relative de ces molécules.

Pendant longtemps, le système immunitaire a été perçu en oncologie comme un simple spectateur passif. Désormais, il est devenu évident qu'il joue un rôle essentiel dans l'oncogénèse. D'une part il a été montré que ses certains de ses composants, comme les lymphocytes B et les macrophages étaient impliqués dans la carcinogénèse induite par l'inflammation [314]. D'autre part, il intervient dans l'oncogénèse précoce pour maintenir les cellules potentiellement tumorigènes sous surveillance. Les cellules T CD8+ et les cellules NK, quant à elles constituent une barrière protectrice constante que les précurseurs tumoraux doivent outrepasser pour conduire au développement tumoral [315]. En outre, un lien non équivoque a été établi entre le succès de la thérapie et les indicateurs d'une réponse immunitaire, à savoir la composition de l'infiltrat tumoral et les polymorphismes de gènes codant pour des modulateurs immunitaires. En effet, l'efficacité de plusieurs schémas thérapeutiques incluant les chimiothérapies conventionnelles et les thérapies ciblées s'avère liée (au moins en partie) à l'activation des effecteurs du système immunitaire innée et adaptatif. Ainsi, plusieurs composés anticancéreux comme les anthracyclines, l'oxaliplatine ou désormais la DIG et la DIGT ont montré leur capacité à stimuler une immunité antitumorale spécifique, permettant, on l'espère l'éradication de cellules tumorales résiduelles pour le traitement prolongé du cancer.

REFERENCES

1. Cancer, I.N.d., *Epidémiologie des cancers en France métropolitaine - Données essentielles*, 2011.
2. CA., L.P., *Thoughts about cancer stem cells in solid tumors*. World J Stem Cells., 2012. **4**(3): p. 17-20.
3. Jordan CT, G.M., Noble M., *Cancer stem cells*. N Engl J Med, 2006. **355**(12): p. 1253-61.
4. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
5. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
6. Zitvogel, L., O. Kepp, and G. Kroemer, *Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens*. Nat Rev Clin Oncol, 2011. **8**(3): p. 151-60.
7. WB., C., *The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893*. Clin Orthop Relat Res, 1991. **262**: p. 3-11.
8. Ehrlich, P., *Über den jetzigen stand der karzinomforschung*. Ned. Tijdschr. Geneesk, 1909. **5**: p. 273-290.
9. Medawar, P.B., *The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits: A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council*. J Anat, 1944. **78**(Pt 5): p. 176-99.
10. Prehn, R.T. and J.M. Main, *Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas*. J Natl Cancer Inst, 1957. **18**(6): p. 769-78.
11. Klein, G., *Tumor antigens*. Annu Rev Microbiol, 1966. **20**: p. 223-52.
12. Burnet, F.M., *The concept of immunological surveillance*. Prog Exp Tumor Res, 1970. **13**: p. 1-27.
13. Stutman, O., *Immunodepression and malignancy*. Adv Cancer Res, 1975. **22**: p. 261-422.
14. Burstein, N.A. and L.W. Law, *Neonatal thymectomy and non-viral mammary tumours in mice*. Nature, 1971. **231**(5303): p. 450-2.
15. Grant GA, M.J., *Effect of neonatal thymectomy on the induction of sarcomata in C57 BL mice*. Nature., 1965. **205**(976): p. 1124-5.
16. Zitvogel, L., L. Apetoh, F. Ghiringhelli, and G. Kroemer, *Immunological aspects of cancer chemotherapy*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(1): p. 59-73.
17. Maleckar, J.R. and L.A. Sherman, *The composition of the T cell repertoire in nude mice*. J Immunol, 1987. **138**(11): p. 3873-6.
18. Hayday, A.C., *[gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 975-1026.
19. Heidelberger, C., *Chemical carcinogenesis*. Annu Rev Biochem, 1975. **44**: p. 79-121.
20. Biot, C., C.A. Rentsch, J.R. Gsponer, F.D. Birkhauser, H. Jusforgues-Saklani, F. Lemaitre, C. Auriau, A. Bachmann, P. Bousso, C. Demangel, L. Peduto, G.N. Thalmann, and M.L. Albert, *Preexisting BCG-Specific T Cells Improve Intravesical Immunotherapy for Bladder Cancer*. Sci Transl Med, 2012. **4**(137): p. 137ra72.
21. Dighe, A.S., E. Richards, L.J. Old, and R.D. Schreiber, *Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors*. Immunity, 1994. **1**(6): p. 447-56.
22. Kaplan, D.H., V. Shankaran, A.S. Dighe, E. Stockert, M. Aguet, L.J. Old, and R.D. Schreiber, *Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7556-61.
23. van den Broek, M.E., D. Kagi, F. Ossendorp, R. Toes, S. Vamvakas, W.K. Lutz, C.J. Melief, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner, *Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice*. J Exp Med, 1996. **184**(5): p. 1781-90.
24. Smyth, M.J., K.Y. Thia, S.E. Street, E. Cretney, J.A. Trapani, M. Taniguchi, T. Kawano, S.B. Pelikan, N.Y. Crowe, and D.I. Godfrey, *Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells*. J Exp Med, 2000. **191**(4): p. 661-8.
25. Girardi, M., D.E. Oppenheim, C.R. Steele, J.M. Lewis, E. Glusac, R. Filler, P. Hobby, B. Sutton, R.E. Tigelaar, and A.C. Hayday, *Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells*. Science, 2001. **294**(5542): p. 605-9.
26. Vesely, M.D., M.H. Kershaw, R.D. Schreiber, and M.J. Smyth, *Natural innate and adaptive immunity to cancer*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 235-71.
27. Shankaran, V., H. Ikeda, A.T. Bruce, J.M. White, P.E. Swanson, L.J. Old, and R.D. Schreiber, *IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1107-11.
28. Smyth, M.J., N.Y. Crowe, and D.I. Godfrey, *NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma*. Int Immunol, 2001. **13**(4): p. 459-63.
29. Street, S.E., E. Cretney, and M.J. Smyth, *Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis*. Blood, 2001. **97**(1): p. 192-7.

30. Liu, J., Z. Xiang, and X. Ma, *Role of IFN regulatory factor-1 and IL-12 in immunological resistance to pathogenesis of N-methyl-N-nitrosourea-induced T lymphoma*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 1184-93.
31. Loser, K., A. Scherer, M.B. Krummen, G. Varga, T. Higuchi, T. Schwarz, A.H. Sharpe, S. Grabbe, J.A. Bluestone, and S. Beissert, *An important role of CD80/CD86-CTLA-4 signaling during photocarcinogenesis in mice*. J Immunol, 2005. **174**(9): p. 5298-305.
32. Smyth, M.J., K.Y. Thia, S.E. Street, D. MacGregor, D.I. Godfrey, and J.A. Trapani, *Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma*. J Exp Med, 2000. **192**(5): p. 755-60.
33. Oppenheim, D.E., S.J. Roberts, S.L. Clarke, R. Filler, J.M. Lewis, R.E. Tigelaar, M. Girardi, and A.C. Hayday, *Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance*. Nat Immunol, 2005. **6**(9): p. 928-37.
34. Cretney, E., K. Takeda, H. Yagita, M. Glaccum, J.J. Peschon, and M.J. Smyth, *Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice*. J Immunol, 2002. **168**(3): p. 1356-61.
35. Langowski, J.L., X. Zhang, L. Wu, J.D. Mattson, T. Chen, K. Smith, B. Basham, T. McClanahan, R.A. Kastelein, and M. Oft, *IL-23 promotes tumour incidence and growth*. Nature, 2006. **442**(7101): p. 461-5.
36. Simson, L., J.I. Ellyard, L.A. Dent, K.I. Matthaei, M.E. Rothenberg, P.S. Foster, M.J. Smyth, and C.R. Parish, *Regulation of carcinogenesis by IL-5 and CCL11: a potential role for eosinophils in tumor immune surveillance*. J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4222-9.
37. Swann, J.B., A.P. Uldrich, S. van Dommelen, J. Sharkey, W.K. Murray, D.I. Godfrey, and M.J. Smyth, *Type I natural killer T cells suppress tumors caused by p53 loss in mice*. Blood, 2009. **113**(25): p. 6382-5.
38. Street, S.E., J.A. Trapani, D. MacGregor, and M.J. Smyth, *Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma*. J Exp Med, 2002. **196**(1): p. 129-34.
39. Zerafa, N., J.A. Westwood, E. Cretney, S. Mitchell, P. Waring, M. Iezzi, and M.J. Smyth, *Cutting edge: TRAIL deficiency accelerates hematological malignancies*. J Immunol, 2005. **175**(9): p. 5586-90.
40. Hayashi, T. and D.L. Faustman, *Development of spontaneous uterine tumors in low molecular mass polypeptide-2 knockout mice*. Cancer Res, 2002. **62**(1): p. 24-7.
41. Davidson, W.F., T. Giese, and T.N. Fredrickson, *Spontaneous development of plasmacytoid tumors in mice with defective Fas-Fas ligand interactions*. J Exp Med, 1998. **187**(11): p. 1825-38.
42. Airoidi, I., E. Di Carlo, C. Cocco, C. Sorrentino, F. Fais, M. Cilli, T. D'Antuono, M.P. Colombo, and V. Pistoia, *Lack of Il12rb2 signaling predisposes to spontaneous autoimmunity and malignancy*. Blood, 2005. **106**(12): p. 3846-53.
43. Street, S.E., N. Zerafa, M. Iezzi, J.A. Westwood, J. Stagg, P. Musiani, and M.J. Smyth, *Host perforin reduces tumor number but does not increase survival in oncogene-driven mammary adenocarcinoma*. Cancer Res, 2007. **67**(11): p. 5454-60.
44. Bellone, M., M. Cecon, M. Grioni, E. Jachetti, A. Calcinotto, A. Napolitano, M. Freschi, G. Casorati, and P. Dellabona, *iNKT cells control mouse spontaneous carcinoma independently of tumor-specific cytotoxic T cells*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8646.
45. Guerra, N., Y.X. Tan, N.T. Joncker, A. Choy, F. Gallardo, N. Xiong, S. Knoblaugh, D. Cado, N.M. Greenberg, and D.H. Raulet, *NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy*. Immunity, 2008. **28**(4): p. 571-80.
46. Starzl, T.E., I. Penn, and C.G. Halgrimson, *Immunosuppression and malignant neoplasms*. N Engl J Med, 1970. **283**(17): p. 934.
47. Gatti, R.A. and R.A. Good, *Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review*. Cancer, 1971. **28**(1): p. 89-98.
48. Loeffelbein, D.J., K. Szilinski, and F. Holzle, *Immunosuppressive regimen influences incidence of skin cancer in renal and pancreatic transplant recipients*. Transplantation, 2009. **88**(12): p. 1398-9.
49. Vajdic, C.M., S.P. McDonald, M.R. McCredie, M.T. van Leeuwen, J.H. Stewart, M. Law, J.R. Chapman, A.C. Webster, J.M. Kaldor, and A.E. Grulich, *Cancer incidence before and after kidney transplantation*. JAMA, 2006. **296**(23): p. 2823-31.
50. Sheil, A.G., *Cancer after transplantation*. World J Surg, 1986. **10**(3): p. 389-96.
51. Boshoff, C. and R. Weiss, *AIDS-related malignancies*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(5): p. 373-82.
52. Chaturvedi, A.K., R.M. Pfeiffer, L. Chang, J.J. Goedert, R.J. Biggar, and E.A. Engels, *Elevated risk of lung cancer among people with AIDS*. AIDS, 2007. **21**(2): p. 207-13.
53. Kirk, G.D., C. Merlo, O.D. P, S.H. Mehta, N. Galai, D. Vlahov, J. Samet, and E.A. Engels, *HIV infection is associated with an increased risk for lung cancer, independent of smoking*. Clin Infect Dis, 2007. **45**(1): p. 103-10.

54. Chia, J., K.P. Yeo, J.C. Whisstock, M.A. Dunstone, J.A. Trapani, and I. Voskoboinik, *Temperature sensitivity of human perforin mutants unmasks subtotal loss of cytotoxicity, delayed FHL, and a predisposition to cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(24): p. 9809-14.
55. Dhodapkar, M.V., *Immune response to premalignancy: insights from patients with monoclonal gammopathy*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1062**: p. 22-8.
56. Meng, S., D. Tripathy, E.P. Frenkel, S. Shete, E.Z. Naftalis, J.F. Huth, P.D. Beitsch, M. Leitch, S. Hoover, D. Euhus, B. Haley, L. Morrison, T.P. Fleming, D. Herlyn, L.W. Terstappen, T. Fehm, T.F. Tucker, N. Lane, J. Wang, and J.W. Uhr, *Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(24): p. 8152-62.
57. Weckermann, D., P. Muller, F. Wawroschek, R. Harzmann, G. Riethmuller, and G. Schlimok, *Disseminated cytokeratin positive tumor cells in the bone marrow of patients with prostate cancer: detection and prognostic value*. J Urol, 2001. **166**(2): p. 699-703.
58. Karrison, T.G., D.J. Ferguson, and P. Meier, *Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(1): p. 80-5.
59. Clemente, C.G., M.C. Mihm, Jr., R. Bufalino, S. Zurrida, P. Collini, and N. Cascinelli, *Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma*. Cancer, 1996. **77**(7): p. 1303-10.
60. Scanlan, M.J., A.J. Simpson, and L.J. Old, *The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary*. Cancer Immun, 2004. **4**: p. 1.
61. Sato, E., S.H. Olson, J. Ahn, B. Bundy, H. Nishikawa, F. Qian, A.A. Jungbluth, D. Frosina, S. Gnjjatic, C. Ambrosone, J. Kepner, T. Odunsi, G. Ritter, S. Lele, Y.T. Chen, H. Ohtani, L.J. Old, and K. Odunsi, *Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(51): p. 18538-43.
62. Naito, Y., K. Saito, K. Shiiba, A. Ohuchi, K. Saigenji, H. Nagura, and H. Ohtani, *CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer*. Cancer Res, 1998. **58**(16): p. 3491-4.
63. Halliday, G.M., A. Patel, M.J. Hunt, F.J. Tefany, and R.S. Barnetson, *Spontaneous regression of human melanoma/nonmelanoma skin cancer: association with infiltrating CD4+ T cells*. World J Surg, 1995. **19**(3): p. 352-8.
64. Iihara, K., K. Yamaguchi, Y. Nishimura, T. Iwasaki, K. Suzuki, and Y. Hirabayashi, *Spontaneous regression of malignant lymphoma of the breast*. Pathol Int, 2004. **54**(7): p. 537-42.
65. Kerr, K.M., S.K. Johnson, G. King, M.M. Kennedy, J. Weir, and R. Jeffrey, *Partial regression in primary carcinoma of the lung: does it occur?* Histopathology, 1998. **33**(1): p. 55-63.
66. Pages, F., A. Berger, M. Camus, F. Sanchez-Cabo, A. Costes, R. Molidor, B. Mlecnik, A. Kirilovsky, M. Nilsson, D. Damotte, T. Meatchi, P. Bruneval, P.H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W.H. Fridman, and J. Galon, *Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(25): p. 2654-66.
67. Galon, J., A. Costes, F. Sanchez-Cabo, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, C. Lagorce-Pages, M. Tosolini, M. Camus, A. Berger, P. Wind, F. Zinzindohoue, P. Bruneval, P.H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W.H. Fridman, and F. Pages, *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome*. Science, 2006. **313**(5795): p. 1960-4.
68. van Houdt, I.S., B.J. Sluijter, L.M. Moesbergen, W.M. Vos, T.D. de Gruijl, B.G. Molenkamp, A.J. van den Eertwegh, E. Hooijberg, P.A. van Leeuwen, C.J. Meijer, and J.J. Oudejans, *Favorable outcome in clinically stage II melanoma patients is associated with the presence of activated tumor infiltrating T-lymphocytes and preserved MHC class I antigen expression*. Int J Cancer, 2008. **123**(3): p. 609-15.
69. 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, *Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival*. Nat Med, 2004. **10**(9): p. 942-9.
70. Hiraoka, N., K. Onozato, T. Kosuge, and S. Hirohashi, *Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(18): p. 5423-34.
71. Salama, P., M. Phillips, F. Grieu, M. Morris, N. Zeps, D. Joseph, C. Platell, and B. Iacopetta, *Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(2): p. 186-92.
72. Badoual, C., S. Hans, J. Rodriguez, S. Peyrard, C. Klein, H. Agueznay Nel, V. Mosseri, O. Laccourreye, P. Bruneval, W.H. Fridman, D.F. Brasnu, and E. Tartour, *Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(2): p. 465-72.

73. van Ravenswaay Claasen, H.H., P.M. Kluin, and G.J. Fleuren, *Tumor infiltrating cells in human cancer. On the possible role of CD16+ macrophages in antitumor cytotoxicity*. Lab Invest, 1992. **67**(2): p. 166-74.
74. Knuth, A., B. Danowski, H.F. Oettgen, and L.J. Old, *T-cell-mediated cytotoxicity against autologous malignant melanoma: analysis with interleukin 2-dependent T-cell cultures*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(11): p. 3511-5.
75. Old, L.J., *Cancer immunology: the search for specificity--G. H. A. Clowes Memorial lecture*. Cancer Res, 1981. **41**(2): p. 361-75.
76. van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth, and T. Boon, *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. Science, 1991. **254**(5038): p. 1643-7.
77. Simpson, A.J., O.L. Caballero, A. Jungbluth, Y.T. Chen, and L.J. Old, *Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(8): p. 615-25.
78. Sahin, U., O. Tureci, H. Schmitt, B. Cochlovius, T. Johannes, R. Schmits, F. Stenner, G. Luo, I. Schobert, and M. Pfreundschuh, *Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(25): p. 11810-3.
79. Scanlan, M.J., A.O. Gure, A.A. Jungbluth, L.J. Old, and Y.T. Chen, *Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy*. Immunol Rev, 2002. **188**: p. 22-32.
80. Srinivasan, R. and J.D. Wolchok, *Tumor antigens for cancer immunotherapy: therapeutic potential of xenogeneic DNA vaccines*. J Transl Med, 2004. **2**(1): p. 12.
81. Jager, E., Y.T. Chen, J.W. Drijfhout, J. Karbach, M. Ringhoffer, D. Jager, M. Arand, H. Wada, Y. Noguchi, E. Stockert, L.J. Old, and A. Knuth, *Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes*. J Exp Med, 1998. **187**(2): p. 265-70.
82. Kawakami, Y., P.F. Robbins, X. Wang, J.P. Tupesis, M.R. Parkhurst, X. Kang, K. Sakaguchi, E. Appella, and S.A. Rosenberg, *Identification of new melanoma epitopes on melanosomal proteins recognized by tumor infiltrating T lymphocytes restricted by HLA-A1, -A2, and -A3 alleles*. J Immunol, 1998. **161**(12): p. 6985-92.
83. Wang, R.F., M.R. Parkhurst, Y. Kawakami, P.F. Robbins, and S.A. Rosenberg, *Utilization of an alternative open reading frame of a normal gene in generating a novel human cancer antigen*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 1131-40.
84. Wang, R.F., E. Appella, Y. Kawakami, X. Kang, and S.A. Rosenberg, *Identification of TRP-2 as a human tumor antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes*. J Exp Med, 1996. **184**(6): p. 2207-16.
85. Kawakami, Y., S. Elyahu, K. Sakaguchi, P.F. Robbins, L. Rivoltini, J.R. Yannelli, E. Appella, and S.A. Rosenberg, *Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes*. J Exp Med, 1994. **180**(1): p. 347-52.
86. Livingston, P.O., G.Y. Wong, S. Adluri, Y. Tao, M. Padavan, R. Parente, C. Hanlon, M.J. Calves, F. Helling, G. Ritter, and et al., *Improved survival in stage III melanoma patients with GM2 antibodies: a randomized trial of adjuvant vaccination with GM2 ganglioside*. J Clin Oncol, 1994. **12**(5): p. 1036-44.
87. Bander, N.H., D.M. Nanus, M.I. Milowsky, L. Kostakoglu, S. Vallabahajosula, and S.J. Goldsmith, *Targeted systemic therapy of prostate cancer with a monoclonal antibody to prostate-specific membrane antigen*. Semin Oncol, 2003. **30**(5): p. 667-76.
88. Houbiers, J.G., S.H. van der Burg, L.M. van de Watering, R.A. Tollenaar, A. Brand, C.J. van de Velde, and C.J. Melief, *Antibodies against p53 are associated with poor prognosis of colorectal cancer*. Br J Cancer, 1995. **72**(3): p. 637-41.
89. Fossum, B., T. Gedde-Dahl, 3rd, J. Breivik, J.A. Eriksen, A. Spurkland, E. Thorsby, and G. Gaudernack, *p21-ras-peptide-specific T-cell responses in a patient with colorectal cancer. CD4+ and CD8+ T cells recognize a peptide corresponding to a common mutation (13Gly-->Asp)*. Int J Cancer, 1994. **56**(1): p. 40-5.
90. Robbins, P.F., M. El-Gamil, Y.F. Li, Y. Kawakami, D. Loftus, E. Appella, and S.A. Rosenberg, *A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 1185-92.
91. Wang, R.F., X. Wang, A.C. Atwood, S.L. Topalian, and S.A. Rosenberg, *Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1351-4.
92. Wolfel, T., M. Hauer, J. Schneider, M. Serrano, C. Wolfel, E. Klehmann-Hieb, E. De Plaen, T. Hankeln, K.H. Meyer zum Buschenfelde, and D. Beach, *A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma*. Science, 1995. **269**(5228): p. 1281-4.

93. Mami-Chouaib, F., H. Echchakir, G. Dorothee, I. Vergnon, and S. Chouaib, *Antitumor cytotoxic T-lymphocyte response in human lung carcinoma: identification of a tumor-associated antigen*. Immunol Rev, 2002. **188**: p. 114-21.
94. Baselga, J. and J. Albanell, *Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies*. Ann Oncol, 2001. **12 Suppl 1**: p. S35-41.
95. Tsuboi, A., Y. Oka, H. Ogawa, O.A. Elisseeva, H. Li, K. Kawasaki, K. Aozasa, T. Kishimoto, K. Udaka, and H. Sugiyama, *Cytotoxic T-lymphocyte responses elicited to Wilms' tumor gene WT1 product by DNA vaccination*. J Clin Immunol, 2000. **20**(3): p. 195-202.
96. Chiari, R., G. Hames, V. Stroobant, C. Texier, B. Maillere, T. Boon, and P.G. Coulie, *Identification of a tumor-specific shared antigen derived from an Eph receptor and presented to CD4 T cells on HLA class II molecules*. Cancer Res, 2000. **60**(17): p. 4855-63.
97. Cohen, R.B., *Epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in colorectal cancer*. Clin Colorectal Cancer, 2003. **2**(4): p. 246-51.
98. Wannesson, L. and M. Ghielmini, *Overview of antibody therapy in B-cell non-Hodgkin's lymphoma*. Clin Lymphoma, 2003. **4 Suppl 1**: p. S5-12.
99. Nair, S.K., A. Heiser, D. Boczkowski, A. Majumdar, M. Naoe, J.S. Lebkowski, J. Vieweg, and E. Gilboa, *Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells*. Nat Med, 2000. **6**(9): p. 1011-7.
100. Zeis, M., S. Siegel, A. Wagner, M. Schmitz, M. Marget, R. Kuhl-Burmeister, I. Adamzik, D. Kabelitz, P. Dreger, N. Schmitz, and A. Heiser, *Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells*. J Immunol, 2003. **170**(11): p. 5391-7.
101. Bauer, S., V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J.H. Phillips, L.L. Lanier, and T. Spies, *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA*. Science, 1999. **285**(5428): p. 727-9.
102. Gasser, S. and D.H. Raulet, *The DNA damage response arouses the immune system*. Cancer Res, 2006. **66**(8): p. 3959-62.
103. Groh, V., J. Wu, C. Yee, and T. Spies, *Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation*. Nature, 2002. **419**(6908): p. 734-8.
104. Jinushi, M., T. Takehara, T. Tatsumi, T. Kanto, V. Groh, T. Spies, R. Kimura, T. Miyagi, K. Mochizuki, Y. Sasaki, and N. Hayashi, *Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid*. Int J Cancer, 2003. **104**(3): p. 354-61.
105. Vetter, C.S., V. Groh, P. thor Straten, T. Spies, E.B. Brocker, and J.C. Becker, *Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma*. J Invest Dermatol, 2002. **118**(4): p. 600-5.
106. Diefenbach, A., E.R. Jensen, A.M. Jamieson, and D.H. Raulet, *Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity*. Nature, 2001. **413**(6852): p. 165-71.
107. Cerwenka, A., J.L. Baron, and L.L. Lanier, *Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11521-6.
108. Carayannopoulos, L.N., O.V. Naidenko, D.H. Fremont, and W.M. Yokoyama, *Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D*. J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4079-83.
109. Diefenbach, A., A.M. Jamieson, S.D. Liu, N. Shastri, and D.H. Raulet, *Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages*. Nat Immunol, 2000. **1**(2): p. 119-26.
110. Yamamoto, T., T. Kimura, E. Ueta, Y. Tatemoto, and T. Osaki, *Characteristic cytokine generation patterns in cancer cells and infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinomas and the influence of chemoradiation combined with immunotherapy on these patterns*. Oncology, 2003. **64**(4): p. 407-15.
111. Mori, S., A. Jewett, K. Murakami-Mori, M. Cavalcanti, and B. Bonavida, *The participation of the Fas-mediated cytotoxic pathway by natural killer cells is tumor-cell-dependent*. Cancer Immunol Immunother, 1997. **44**(5): p. 282-90.
112. Takeda, K., Y. Hayakawa, M.J. Smyth, N. Kayagaki, N. Yamaguchi, S. Kakuta, Y. Iwakura, H. Yagita, and K. Okumura, *Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells*. Nat Med, 2001. **7**(1): p. 94-100.
113. Zitvogel, L., M. Terme, C. Borg, and G. Trinchieri, *Dendritic cell-NK cell cross-talk: regulation and physiopathology*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **298**: p. 157-74.
114. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 991-1045.
115. Smyth, M.J., D.I. Godfrey, and J.A. Trapani, *A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy*. Nat Immunol, 2001. **2**(4): p. 293-9.

116. Street, S.E., Y. Hayakawa, Y. Zhan, A.M. Lew, D. MacGregor, A.M. Jamieson, A. Diefenbach, H. Yagita, D.I. Godfrey, and M.J. Smyth, *Innate immune surveillance of spontaneous B cell lymphomas by natural killer cells and gammadelta T cells*. *J Exp Med*, 2004. **199**(6): p. 879-84.
117. Gollob, J.A., C.J. Sciambi, Z. Huang, and H.K. Dressman, *Gene expression changes and signaling events associated with the direct antimelanoma effect of IFN-gamma*. *Cancer Res*, 2005. **65**(19): p. 8869-77.
118. Qin, Z., J. Schwartzkopff, F. Pradera, T. Kammertoens, B. Seliger, H. Pircher, and T. Blankenstein, *A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells*. *Cancer Res*, 2003. **63**(14): p. 4095-100.
119. Wall, L., F. Burke, C. Barton, J. Smyth, and F. Balkwill, *IFN-gamma induces apoptosis in ovarian cancer cells in vivo and in vitro*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(7): p. 2487-96.
120. Angiolillo, A.L., C. Sgadari, D.D. Taub, F. Liao, J.M. Farber, S. Maheshwari, H.K. Kleinman, G.H. Reaman, and G. Tosato, *Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo*. *J Exp Med*, 1995. **182**(1): p. 155-62.
121. Ikeda, H., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002. **13**(2): p. 95-109.
122. Shi, Y., J.E. Evans, and K.L. Rock, *Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells*. *Nature*, 2003. **425**(6957): p. 516-21.
123. Kim, R., M. Emi, and K. Tanabe, *Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape*. *Immunology*, 2007. **121**(1): p. 1-14.
124. Wheelock, E.F., K.J. Weinhold, and J. Levich, *The tumor dormant state*. *Adv Cancer Res*, 1981. **34**: p. 107-40.
125. Aguirre-Ghiso, J.A., *Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(11): p. 834-46.
126. Koebel, C.M., W. Vermi, J.B. Swann, N. Zerafa, S.J. Rodig, L.J. Old, M.J. Smyth, and R.D. Schreiber, *Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state*. *Nature*, 2007. **450**(7171): p. 903-7.
127. Smyth, M.J., G.P. Dunn, and R.D. Schreiber, *Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity*. *Adv Immunol*, 2006. **90**: p. 1-50.
128. Matsushita, H., M.D. Vesely, D.C. Koboldt, C.G. Rickert, R. Uppaluri, V.J. Magrini, C.D. Arthur, J.M. White, Y.S. Chen, L.K. Shea, J. Hundal, M.C. Wendl, R. Demeter, T. Wylie, J.P. Allison, M.J. Smyth, L.J. Old, E.R. Mardis, and R.D. Schreiber, *Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting*. *Nature*, 2012. **482**(7385): p. 400-4.
129. Willimsky, G. and T. Blankenstein, *Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance*. *Nature*, 2005. **437**(7055): p. 141-6.
130. Kyewski, B. and L. Klein, *A central role for central tolerance*. *Annu Rev Immunol*, 2006. **24**: p. 571-606.
131. Schell, T.D., B.B. Knowles, and S.S. Tevethia, *Sequential loss of cytotoxic T lymphocyte responses to simian virus 40 large T antigen epitopes in T antigen transgenic mice developing osteosarcomas*. *Cancer Res*, 2000. **60**(11): p. 3002-12.
132. Khong, H.T. and N.P. Restifo, *Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(11): p. 999-1005.
133. Zheng, P., Y. Yang, S. Li, J. Li, W. Gong, and Z. Quan, *A given number of effector T cells can only destroy a limited number of target cells in graft rejection*. *Transpl Immunol*, 2010. **23**(3): p. 111-6.
134. Dunn, G.P., C.M. Koebel, and R.D. Schreiber, *Interferons, immunity and cancer immunoediting*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(11): p. 836-48.
135. Restifo, N.P., F.M. Marincola, Y. Kawakami, J. Taubenberger, J.R. Yannelli, and S.A. Rosenberg, *Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy*. *J Natl Cancer Inst*, 1996. **88**(2): p. 100-8.
136. Dunn, G.P., K.C. Sheehan, L.J. Old, and R.D. Schreiber, *IFN unresponsiveness in LNCaP cells due to the lack of JAK1 gene expression*. *Cancer Res*, 2005. **65**(8): p. 3447-53.
137. Stern-Ginossar, N., C. Gur, M. Biton, E. Horwitz, M. Elboim, N. Stanietsky, M. Mandelboim, and O. Mandelboim, *Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(9): p. 1065-73.
138. Wang, T., G. Niu, M. Kortylewski, L. Burdelya, K. Shain, S. Zhang, R. Bhattacharya, D. Gabilovich, R. Heller, D. Coppola, W. Dalton, R. Jove, D. Pardoll, and H. Yu, *Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells*. *Nat Med*, 2004. **10**(1): p. 48-54.
139. Sica, A., A. Saccani, B. Bottazzi, N. Polentarutti, A. Vecchi, J. van Damme, and A. Mantovani, *Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages*. *J Immunol*, 2000. **164**(2): p. 762-7.

140. Mantovani, A., S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena, and A. Sica, *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 549-55.
141. Dvorak, H.F., *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing*. N Engl J Med, 1986. **315**(26): p. 1650-9.
142. Woo, E.Y., C.S. Chu, T.J. Goletz, K. Schlienger, H. Yeh, G. Coukos, S.C. Rubin, L.R. Kaiser, and C.H. June, *Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(12): p. 4766-72.
143. Liyanage, U.K., T.T. Moore, H.G. Joo, Y. Tanaka, V. Herrmann, G. Doherty, J.A. Drebin, S.M. Strasberg, T.J. Eberlein, P.S. Goedegebuure, and D.C. Linehan, *Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma*. J Immunol, 2002. **169**(5): p. 2756-61.
144. Kobayashi, N., N. Hiraoka, W. Yamagami, H. Ojima, Y. Kanai, T. Kosuge, A. Nakajima, and S. Hirohashi, *FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(3): p. 902-11.
145. Pinzon-Charry, A., C.S. Ho, R. Laherty, T. Maxwell, D. Walker, R.A. Gardiner, L. O'Connor, C. Pyke, C. Schmidt, C. Furnival, and J.A. Lopez, *A population of HLA-DR+ immature cells accumulates in the blood dendritic cell compartment of patients with different types of cancer*. Neoplasia, 2005. **7**(12): p. 1112-22.
146. Almand, B., J.I. Clark, E. Nikitina, J. van Beynen, N.R. English, S.C. Knight, D.P. Carbone, and D.I. Gabrilovich, *Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 678-89.
147. Melcher, A., M. Gough, S. Todryk, and R. Vile, *Apoptosis or necrosis for tumor immunotherapy: what's in a name?* J Mol Med (Berl), 1999. **77**(12): p. 824-33.
148. Rasmussen, L. and A. Arvin, *Chemotherapy-induced immunosuppression*. Environ Health Perspect, 1982. **43**: p. 21-5.
149. Mattarollo, S.R., S. Loi, H. Duret, Y. Ma, L. Zitvogel, and M.J. Smyth, *Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors*. Cancer Res, 2011. **71**(14): p. 4809-20.
150. Lutsiak, M.E., R.T. Semnani, R. De Pascalis, S.V. Kashmiri, J. Schlom, and H. Sabzevari, *Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2862-8.
151. Tesniere, A., F. Schlemmer, V. Boige, O. Kepp, I. Martins, F. Ghiringhelli, L. Aymeric, M. Michaud, L. Apetoh, L. Barault, J. Mendiboure, J.P. Pignon, V. Jooste, P. van Endert, M. Ducreux, L. Zitvogel, F. Piard, and G. Kroemer, *Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin*. Oncogene, 2010. **29**(4): p. 482-91.
152. Reits, E.A., J.W. Hodge, C.A. Herberts, T.A. Groothuis, M. Chakraborty, E.K. Wansley, K. Camphausen, R.M. Luiten, A.H. de Ru, J. Neijssen, A. Griekspoor, E. Mesman, F.A. Verreck, H. Spits, J. Schlom, P. van Veelen, and J.J. Neefjes, *Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy*. J Exp Med, 2006. **203**(5): p. 1259-71.
153. Chakraborty, M., S.I. Abrams, C.N. Coleman, K. Camphausen, J. Schlom, and J.W. Hodge, *External beam radiation of tumors alters phenotype of tumor cells to render them susceptible to vaccine-mediated T-cell killing*. Cancer Res, 2004. **64**(12): p. 4328-37.
154. Gasser, S., S. Orsulic, E.J. Brown, and D.H. Raulet, *The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor*. Nature, 2005. **436**(7054): p. 1186-90.
155. Obeid, M., A. Tesniere, F. Ghiringhelli, G.M. Fimia, L. Apetoh, J.L. Perfettini, M. Castedo, G. Mignot, T. Panaretakis, N. Casares, D. Metivier, N. Larochette, P. van Endert, F. Ciccosanti, M. Piacentini, L. Zitvogel, and G. Kroemer, *Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death*. Nat Med, 2007. **13**(1): p. 54-61.
156. Orsini, F., Z. Pavelic, and E. Mihich, *Increased primary cell-mediated immunity in culture subsequent to adriamycin or daunorubicin treatment of spleen donor mice*. Cancer Res, 1977. **37**(6): p. 1719-26.
157. Arinaga, S., T. Akiyoshi, and H. Tsuji, *Augmentation of the generation of cell-mediated cytotoxicity after a single dose of adriamycin in cancer patients*. Cancer Res, 1986. **46**(8): p. 4213-6.
158. Nigam, A., R.F. Yacavone, M.L. Zahurak, C.M. Johns, D.M. Pardoll, S. Piantadosi, H.I. Levitsky, and W.G. Nelson, *Immunomodulatory properties of antineoplastic drugs administered in conjunction with GM-CSF-secreting cancer cell vaccines*. Int J Oncol, 1998. **12**(1): p. 161-70.
159. Tanaka, H., H. Matsushima, N. Mizumoto, and A. Takashima, *Classification of chemotherapeutic agents based on their differential in vitro effects on dendritic cells*. Cancer Res, 2009. **69**(17): p. 6978-86.

160. Casares, N., M.O. Pequignot, A. Tesniere, F. Ghiringhelli, S. Roux, N. Chaput, E. Schmitt, A. Hamai, S. Hervas-Stubbs, M. Obeid, F. Coutant, D. Metivier, E. Pichard, P. Aucouturier, G. Pierron, C. Garrido, L. Zitvogel, and G. Kroemer, *Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death*. *J Exp Med*, 2005. **202**(12): p. 1691-701.
161. Nowak, A.K., B.W. Robinson, and R.A. Lake, *Gemcitabine exerts a selective effect on the humoral immune response: implications for combination chemo-immunotherapy*. *Cancer Res*, 2002. **62**(8): p. 2353-8.
162. Qin, Z., G. Richter, T. Schuler, S. Ibe, X. Cao, and T. Blankenstein, *B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity*. *Nat Med*, 1998. **4**(5): p. 627-30.
163. Vincent, J., G. Mignot, F. Chalmin, S. Ladoire, M. Bruchard, A. Chevriaux, F. Martin, L. Apetoh, C. Rebe, and F. Ghiringhelli, *5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity*. *Cancer Res*, 2010. **70**(8): p. 3052-61.
164. Suzuki, E., V. Kapoor, A.S. Jassar, L.R. Kaiser, and S.M. Albelda, *Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(18): p. 6713-21.
165. Galetto, A., S. Buttiglieri, S. Forno, F. Moro, A. Mussa, and L. Matera, *Drug- and cell-mediated antitumor cytotoxicities modulate cross-presentation of tumor antigens by myeloid dendritic cells*. *Anticancer Drugs*, 2003. **14**(10): p. 833-43.
166. Spisek, R., A. Charalambous, A. Mazumder, D.H. Vesole, S. Jagannath, and M.V. Dhodapkar, *Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications*. *Blood*, 2007. **109**(11): p. 4839-45.
167. Spisek, R. and M.V. Dhodapkar, *Towards a better way to die with chemotherapy: role of heat shock protein exposure on dying tumor cells*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(16): p. 1962-5.
168. Fernandez, N.C., A. Lozier, C. Flament, P. Ricciardi-Castagnoli, D. Bellet, M. Suter, M. Perricaudet, T. Tursz, E. Maraskovsky, and L. Zitvogel, *Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo*. *Nat Med*, 1999. **5**(4): p. 405-11.
169. Garg, A.D., D.V. Krysko, T. Verfaillie, A. Kaczmarek, G.B. Ferreira, T. Marysael, N. Rubio, M. Firczuk, C. Mathieu, A.J. Roebroek, W. Annaert, J. Golab, P. de Witte, P. Vandenabeele, and P. Agostinis, *A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death*. *EMBO J*, 2012. **31**(5): p. 1062-79.
170. Vicari, A.P., R. Luu, N. Zhang, S. Patel, S.R. Mäkinen, D.C. Hanson, R.D. Weeratna, and A.M. Krieg, *Paclitaxel reduces regulatory T cell numbers and inhibitory function and enhances the anti-tumor effects of the TLR9 agonist PF-3512676 in the mouse*. *Cancer Immunol Immunother*, 2009. **58**(4): p. 615-28.
171. Kirikae, T., I. Ojima, C. Fueno-Oderda, S. Lin, F. Kirikae, M. Hashimoto, and M. Nakanoc, *Structural significance of the acyl group at the C-10 position and the A ring of the taxane core of paclitaxel for inducing nitric oxide and tumor necrosis factor production by murine macrophages*. *FEBS Lett*, 2000. **478**(3): p. 221-6.
172. Tesniere, A., T. Panaretakis, O. Kepp, L. Apetoh, F. Ghiringhelli, L. Zitvogel, and G. Kroemer, *Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death*. *Cell Death Differ*, 2008. **15**(1): p. 3-12.
173. Savill, J., I. Dransfield, C. Gregory, and C. Haslett, *A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(12): p. 965-75.
174. Krysko, D.V., K. D'Herde, and P. Vandenabeele, *Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences*. *Apoptosis*, 2006. **11**(10): p. 1709-26.
175. Garg, A.D., D. Nowis, J. Golab, P. Vandenabeele, D.V. Krysko, and P. Agostinis, *Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1805**(1): p. 53-71.
176. Gardai, S.J., K.A. McPhillips, S.C. Frasch, W.J. Janssen, A. Starefeldt, J.E. Murphy-Ullrich, D.L. Bratton, P.A. Oldenborg, M. Michalak, and P.M. Henson, *Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte*. *Cell*, 2005. **123**(2): p. 321-34.
177. Green, D.R., T. Ferguson, L. Zitvogel, and G. Kroemer, *Immunogenic and tolerogenic cell death*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(5): p. 353-63.
178. Kono, H. and K.L. Rock, *How dying cells alert the immune system to danger*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(4): p. 279-89.
179. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system*. *Science*, 2002. **296**(5566): p. 298-300.

180. Obeid, M., T. Panaretakis, N. Joza, R. Tufi, A. Tesniere, P. van Endert, L. Zitvogel, and G. Kroemer, *Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis*. *Cell Death Differ*, 2007. **14**(10): p. 1848-50.
181. Tesniere, A., L. Apetoh, F. Ghiringhelli, N. Joza, T. Panaretakis, O. Kepp, F. Schlemmer, L. Zitvogel, and G. Kroemer, *Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm*. *Curr Opin Immunol*, 2008. **20**(5): p. 504-11.
182. Apetoh, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, A. Criollo, C. Ortiz, R. Lidereau, C. Mariette, N. Chaput, J.P. Mira, S. Delalogue, F. Andre, T. Tursz, G. Kroemer, and L. Zitvogel, *The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy*. *Immunol Rev*, 2007. **220**: p. 47-59.
183. Disis, M.L., *Immune regulation of cancer*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(29): p. 4531-8.
184. Pages, F., J. Galon, M.C. Dieu-Nosjean, E. Tartour, C. Sautes-Fridman, and W.H. Fridman, *Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored*. *Oncogene*, 2010. **29**(8): p. 1093-102.
185. Ellgaard, L. and E.M. Frickel, *Calnexin, calreticulin, and ERp57: teammates in glycoprotein folding*. *Cell Biochem Biophys*, 2003. **39**(3): p. 223-47.
186. Solheim, J.C., *Class I MHC molecules: assembly and antigen presentation*. *Immunol Rev*, 1999. **172**: p. 11-9.
187. Spee, P. and J. Neefjes, *TAP-translocated peptides specifically bind proteins in the endoplasmic reticulum, including gp96, protein disulfide isomerase and calreticulin*. *Eur J Immunol*, 1997. **27**(9): p. 2441-9.
188. Obeid, M., A. Tesniere, T. Panaretakis, R. Tufi, N. Joza, P. van Endert, F. Ghiringhelli, L. Apetoh, N. Chaput, C. Flament, E. Ullrich, S. de Botton, L. Zitvogel, and G. Kroemer, *Ecto-calreticulin in immunogenic chemotherapy*. *Immunol Rev*, 2007. **220**: p. 22-34.
189. Panaretakis, T., N. Joza, N. Modjtahedi, A. Tesniere, I. Vitale, M. Durchschlag, G.M. Fimia, O. Kepp, M. Piacentini, K.U. Froehlich, P. van Endert, L. Zitvogel, F. Madeo, and G. Kroemer, *The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death*. *Cell Death Differ*, 2008. **15**(9): p. 1499-509.
190. Panaretakis, T., O. Kepp, U. Brockmeier, A. Tesniere, A.C. Bjorklund, D.C. Chapman, M. Durchschlag, N. Joza, G. Pierron, P. van Endert, J. Yuan, L. Zitvogel, F. Madeo, D.B. Williams, and G. Kroemer, *Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death*. *EMBO J*, 2009. **28**(5): p. 578-90.
191. Duus, K., R.T. Pagh, U. Holmskov, P. Hojrup, S. Skov, and G. Houen, *Interaction of calreticulin with CD40 ligand, TRAIL and Fas ligand*. *Scand J Immunol*, 2007. **66**(5): p. 501-7.
192. Zitvogel, L., O. Kepp, and G. Kroemer, *Decoding cell death signals in inflammation and immunity*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 798-804.
193. Berwin, B., Y. Delneste, R.V. Lovingood, S.R. Post, and S.V. Pizzo, *SREC-1, a type F scavenger receptor, is an endocytic receptor for calreticulin*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(49): p. 51250-7.
194. Bajor, A., S. Tischer, C. Figueiredo, M. Wittmann, S. Immenschuh, R. Blasczyk, and B. Eiz-Vesper, *Modulatory role of calreticulin as chaperone for dendritic cell-based immunotherapy*. *Clin Exp Immunol*, 2011. **165**(2): p. 220-34.
195. Ogden, C.A., A. deCathelineau, P.R. Hoffmann, D. Bratton, B. Ghebrehiwet, V.A. Fadok, and P.M. Henson, *Clq and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells*. *J Exp Med*, 2001. **194**(6): p. 781-95.
196. Basu, S. and P.K. Srivastava, *Calreticulin, a peptide-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, elicits tumor- and peptide-specific immunity*. *J Exp Med*, 1999. **189**(5): p. 797-802.
197. Mukhopadhyaya, A., J. Mendecki, X. Dong, L. Liu, S. Kalnicki, M. Garg, A. Alfieri, and C. Guha, *Localized hyperthermia combined with intratumoral dendritic cells induces systemic antitumor immunity*. *Cancer Res*, 2007. **67**(16): p. 7798-806.
198. Melcher, A., S. Todryk, N. Hardwick, M. Ford, M. Jacobson, and R.G. Vile, *Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression*. *Nat Med*, 1998. **4**(5): p. 581-7.
199. Wang, X.Y., H. Arnouk, X. Chen, L. Kazim, E.A. Repasky, and J.R. Subjeck, *Extracellular targeting of endoplasmic reticulum chaperone glucose-regulated protein 170 enhances tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma*. *J Immunol*, 2006. **177**(3): p. 1543-51.
200. Srivastava, P.K., *Immunotherapy for human cancer using heat shock protein-peptide complexes*. *Curr Oncol Rep*, 2005. **7**(2): p. 104-8.
201. Srivastava, P., *Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(3): p. 185-94.

202. Ghiringhelli, F., L. Apetoh, A. Tesniere, L. Aymeric, Y. Ma, C. Ortiz, K. Vermaelen, T. Panaretakis, G. Mignot, E. Ullrich, J.L. Perfettini, F. Schlemmer, E. Tasdemir, M. Uhl, P. Genin, A. Civas, B. Ryffel, J. Kanellopoulos, J. Tschopp, F. Andre, R. Lidereau, N.M. McLaughlin, N.M. Haynes, M.J. Smyth, G. Kroemer, and L. Zitvogel, *Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors*. Nat Med, 2009. **15**(10): p. 1170-8.
203. Aymeric, L., L. Apetoh, F. Ghiringhelli, A. Tesniere, I. Martins, G. Kroemer, M.J. Smyth, and L. Zitvogel, *Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity*. Cancer Res, 2010. **70**(3): p. 855-8.
204. Kanneganti, T.D., N. Ozoren, M. Body-Malapel, A. Amer, J.H. Park, L. Franchi, J. Whitfield, W. Barchet, M. Colonna, P. Vandenabeele, J. Bertin, A. Coyle, E.P. Grant, S. Akira, and G. Nunez, *Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3*. Nature, 2006. **440**(7081): p. 233-6.
205. Selzner, N., M. Selzner, R. Graf, U. Ungethuen, J.G. Fitz, and P.A. Clavien, *Water induces autocrine stimulation of tumor cell killing through ATP release and P2 receptor binding*. Cell Death Differ, 2004. **11 Suppl 2**: p. S172-80.
206. Homolya, L., W.C. Watt, E.R. Lazarowski, B.H. Koller, and R.C. Boucher, *Nucleotide-regulated calcium signaling in lung fibroblasts and epithelial cells from normal and P2Y(2) receptor (-/-) mice*. J Biol Chem, 1999. **274**(37): p. 26454-60.
207. Elliott, M.R., F.B. Chekeni, P.C. Trampont, E.R. Lazarowski, A. Kadl, S.F. Walk, D. Park, R.I. Woodson, M. Ostankovich, P. Sharma, J.J. Lysiak, T.K. Harden, N. Leitinger, and K.S. Ravichandran, *Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance*. Nature, 2009. **461**(7261): p. 282-6.
208. Lamkanfi, M., J.L. Mueller, A.C. Vitari, S. Misaghi, A. Fedorova, K. Deshayes, W.P. Lee, H.M. Hoffman, and V.M. Dixit, *Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome*. J Cell Biol, 2009. **187**(1): p. 61-70.
209. Agostini, L., F. Martinon, K. Burns, M.F. McDermott, P.N. Hawkins, and J. Tschopp, *NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder*. Immunity, 2004. **20**(3): p. 319-25.
210. Gu, B.J., W. Zhang, R.A. Worthington, R. Sluyter, P. Dao-Ung, S. Petrou, J.A. Barden, and J.S. Wiley, *A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor*. J Biol Chem, 2001. **276**(14): p. 11135-42.
211. Sluyter, R., A.N. Shemon, and J.S. Wiley, *Glu496 to Ala polymorphism in the P2X7 receptor impairs ATP-induced IL-1 beta release from human monocytes*. J Immunol, 2004. **172**(6): p. 3399-405.
212. Klionsky, D.J. and S.D. Emr, *Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation*. Science, 2000. **290**(5497): p. 1717-21.
213. Levine, B. and D.J. Klionsky, *Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy*. Dev Cell, 2004. **6**(4): p. 463-77.
214. Kondo, Y., T. Kanzawa, R. Sawaya, and S. Kondo, *The role of autophagy in cancer development and response to therapy*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(9): p. 726-34.
215. Blume-Jensen, P. and T. Hunter, *Oncogenic kinase signalling*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 355-65.
216. Vivanco, I. and C.L. Sawyers, *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(7): p. 489-501.
217. Cuervo, A.M., *Autophagy: in sickness and in health*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(2): p. 70-7.
218. Kihara, A., Y. Kabeya, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori, *Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network*. EMBO Rep, 2001. **2**(4): p. 330-5.
219. Liang, X.H., S. Jackson, M. Seaman, K. Brown, B. Kempkes, H. Hibshoosh, and B. Levine, *Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1*. Nature, 1999. **402**(6762): p. 672-6.
220. Qu, X., J. Yu, G. Bhagat, N. Furuya, H. Hibshoosh, A. Troxel, J. Rosen, E.L. Eskelinen, N. Mizushima, Y. Ohsumi, G. Cattoretti, and B. Levine, *Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1809-20.
221. Yue, Z., S. Jin, C. Yang, A.J. Levine, and N. Heintz, *Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 15077-82.
222. Boya, P., R.A. Gonzalez-Polo, N. Casares, J.L. Perfettini, P. Dessen, N. Larochette, D. Metivier, D. Meley, S. Souquere, T. Yoshimori, G. Pierron, P. Codogno, and G. Kroemer, *Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(3): p. 1025-40.
223. Mizushima, N., A. Yamamoto, M. Hatano, Y. Kobayashi, Y. Kabeya, K. Suzuki, T. Tokuhiya, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori, *Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells*. J Cell Biol, 2001. **152**(4): p. 657-68.

224. Nemoto, T., I. Tanida, E. Tanida-Miyake, N. Minematsu-Ikeguchi, M. Yokota, M. Ohsumi, T. Ueno, and E. Kominami, *The mouse APG10 homologue, an E2-like enzyme for Apg12p conjugation, facilitates MAP-LC3 modification*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(41): p. 39517-26.
225. Michaud, M., I. Martins, A.Q. Sukkurwala, S. Adjemian, Y. Ma, P. Pellegatti, S. Shen, O. Kepp, M. Scoazec, G. Mignot, S. Rello-Varona, M. Tailler, L. Menger, E. Vacchelli, L. Galluzzi, F. Ghiringhelli, F. di Virgilio, L. Zitvogel, and G. Kroemer, *Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice*. *Science*, 2011. **334**(6062): p. 1573-7.
226. Martins, I., M. Michaud, A.Q. Sukkurwala, S. Adjemian, Y. Ma, S. Shen, O. Kepp, L. Menger, E. Vacchelli, L. Galluzzi, L. Zitvogel, and G. Kroemer, *Premortem autophagy determines the immunogenicity of chemotherapy-induced cancer cell death*. *Autophagy*, 2012. **8**(3).
227. Ma, Y., L. Aymeric, C. Locher, S.R. Mattarollo, N.F. Delahaye, P. Pereira, L. Boucontet, L. Apetoh, F. Ghiringhelli, N. Casares, J.J. Lasarte, G. Matsuzaki, K. Ikuta, B. Ryffel, K. Benlagha, A. Tesniere, N. Ibrahim, J. Dechanet-Merville, N. Chaput, M.J. Smyth, G. Kroemer, and L. Zitvogel, *Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy*. *J Exp Med*, 2011. **208**(3): p. 491-503.
228. Hannani, D., Y. Ma, T. Yamazaki, J. Dechanet-Merville, G. Kroemer, and L. Zitvogel, *Harnessing gammadelta T cells in anticancer immunotherapy*. *Trends Immunol*, 2012. **33**(5): p. 199-206.
229. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho, *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(8): p. 675-80.
230. Marshak-Rothstein, A. and I.R. Rifkin, *Immunologically active autoantigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease*. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 419-41.
231. Marshak-Rothstein, A., *Toll-like receptors in systemic autoimmune disease*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(11): p. 823-35.
232. Apetoh, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, M. Obeid, C. Ortiz, A. Criollo, G. Mignot, M.C. Maiuri, E. Ullrich, P. Saulnier, H. Yang, S. Amigorena, B. Ryffel, F.J. Barrat, P. Saftig, F. Levi, R. Lidereau, C. Nogues, J.P. Mira, A. Chompret, V. Joulin, F. Clavel-Chapelon, J. Bourhis, F. Andre, S. Delaloge, T. Tursz, G. Kroemer, and L. Zitvogel, *Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy*. *Nat Med*, 2007. **13**(9): p. 1050-9.
233. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 335-76.
234. Shiratsuchi, A., I. Watanabe, O. Takeuchi, S. Akira, and Y. Nakanishi, *Inhibitory effect of Toll-like receptor 4 on fusion between phagosomes and endosomes/lysosomes in macrophages*. *J Immunol*, 2004. **172**(4): p. 2039-47.
235. Jiang, D., J. Liang, J. Fan, S. Yu, S. Chen, Y. Luo, G.D. Prestwich, M.M. Mascarenhas, H.G. Garg, D.A. Quinn, R.J. Homer, D.R. Goldstein, R. Bucala, P.J. Lee, R. Medzhitov, and P.W. Noble, *Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan*. *Nat Med*, 2005. **11**(11): p. 1173-9.
236. Biragyn, A., P.A. Ruffini, C.A. Leifer, E. Klyushnenkova, A. Shakhov, O. Chertov, A.K. Shirakawa, J.M. Farber, D.M. Segal, J.J. Oppenheim, and L.W. Kwak, *Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2*. *Science*, 2002. **298**(5595): p. 1025-9.
237. Tsung, A., R. Sahai, H. Tanaka, A. Nakao, M.P. Fink, M.T. Lotze, H. Yang, J. Li, K.J. Tracey, D.A. Geller, and T.R. Billiar, *The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion*. *J Exp Med*, 2005. **201**(7): p. 1135-43.
238. Yang, D., Q. Chen, H. Yang, K.J. Tracey, M. Bustin, and J.J. Oppenheim, *High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin*. *J Leukoc Biol*, 2007. **81**(1): p. 59-66.
239. Palumbo, R., M. Sampaolesi, F. De Marchis, R. Tonlorenzi, S. Colombetti, A. Mondino, G. Cossu, and M.E. Bianchi, *Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation*. *J Cell Biol*, 2004. **164**(3): p. 441-9.
240. Guazzi, S., A. Strangio, A.T. Franzi, and M.E. Bianchi, *HMGB1, an architectural chromatin protein and extracellular signalling factor, has a spatially and temporally restricted expression pattern in mouse brain*. *Gene Expr Patterns*, 2003. **3**(1): p. 29-33.
241. Scaffidi, P., T. Misteli, and M.E. Bianchi, *Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation*. *Nature*, 2002. **418**(6894): p. 191-5.
242. Bell, C.W., W. Jiang, C.F. Reich, 3rd, and D.S. Pisetsky, *The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006. **291**(6): p. C1318-25.
243. Thorburn, J., H. Horita, J. Redzic, K. Hansen, A.E. Frankel, and A. Thorburn, *Autophagy regulates selective HMGB1 release in tumor cells that are destined to die*. *Cell Death Differ*, 2009. **16**(1): p. 175-83.

244. Tian, J., A.M. Avalos, S.Y. Mao, B. Chen, K. Senthil, H. Wu, P. Parroche, S. Drabic, D. Golenbock, C. Sirois, J. Hua, L.L. An, L. Audoly, G. La Rosa, A. Bierhaus, P. Naworth, A. Marshak-Rothstein, M.K. Crow, K.A. Fitzgerald, E. Latz, P.A. Kiener, and A.J. Coyle, *Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(5): p. 487-96.
245. Zhu, X.M., Y.M. Yao, H.P. Liang, C.T. Xu, N. Dong, Y. Yu, and Z.Y. Sheng, *High mobility group box-1 protein regulate immunosuppression of regulatory T cells through toll-like receptor 4*. *Cytokine*, 2011. **54**(3): p. 296-304.
246. Park, J.S., D. Svetkauskaite, Q. He, J.Y. Kim, D. Strassheim, A. Ishizaka, and E. Abraham, *Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(9): p. 7370-7.
247. Orlova, V.V., E.Y. Choi, C. Xie, E. Chavakis, A. Bierhaus, E. Ihanus, C.M. Ballantyne, C.G. Gahmberg, M.E. Bianchi, P.P. Nawroth, and T. Chavakis, *A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin*. *EMBO J*, 2007. **26**(4): p. 1129-39.
248. Kazama, H., J.E. Ricci, J.M. Herndon, G. Hoppe, D.R. Green, and T.A. Ferguson, *Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein*. *Immunity*, 2008. **29**(1): p. 21-32.
249. Tang, D., M.T. Loze, H.J. Zeh, and R. Kang, *The redox protein HMGB1 regulates cell death and survival in cancer treatment*. *Autophagy*, 2010. **6**(8): p. 1181-3.
250. Arbour, N.C., E. Lorenz, B.C. Schutte, J. Zabner, J.N. Kline, M. Jones, K. Frees, J.L. Watt, and D.A. Schwartz, *TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans*. *Nat Genet*, 2000. **25**(2): p. 187-91.
251. Apetoh, L., A. Tesniere, F. Ghiringhelli, G. Kroemer, and L. Zitvogel, *Molecular interactions between dying tumor cells and the innate immune system determine the efficacy of conventional anticancer therapies*. *Cancer Res*, 2008. **68**(11): p. 4026-30.
252. Vacchelli, E., L. Galluzzi, V. Rousseau, A. Rigoni, A. Tesniere, N. Delahaye, F.D. Schlemmer, L. Menger, A.Q. Sukkurwala, S. Adjemian, I. Martins, M. Michaud, A. Dunant, O. Kepp, E. Brambilla, J.C. Soria, L. Zitvogel, and G. Kroemer, *Loss-of-function alleles of P2RX7 and TLR4 fail to affect the response to chemotherapy in non-small cell lung cancer*. *Oncoimmunology*, 2012. **1**(3): p. 271-278.
253. Kepp, O., L. Galluzzi, M. Lipinski, J. Yuan, and G. Kroemer, *Cell death assays for drug discovery*. *Nat Rev Drug Discov*, 2011. **10**(3): p. 221-37.
254. Galluzzi, L., S.A. Aaronson, J. Abrams, E.S. Alnemri, D.W. Andrews, E.H. Baehrecke, N.G. Bazan, M.V. Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, D.E. Bredesen, C. Brenner, M. Castedo, J.A. Cidlowski, A. Ciechanover, G.M. Cohen, V. De Laurenzi, R. De Maria, M. Deshmukh, B.D. Dynlacht, W.S. El-Deiry, R.A. Flavell, S. Fulda, C. Garrido, P. Golstein, M.L. Gougeon, D.R. Green, H. Gronemeyer, G. Hajnoczky, J.M. Hardwick, M.O. Hengartner, H. Ichijo, M. Jaattela, O. Kepp, A. Kimchi, D.J. Klionsky, R.A. Knight, S. Kornbluth, S. Kumar, B. Levine, S.A. Lipton, E. Lugli, F. Madeo, W. Malomi, J.C. Marine, S.J. Martin, J.P. Medema, P. Mehlen, G. Melino, U.M. Moll, E. Morselli, S. Nagata, D.W. Nicholson, P. Nicotera, G. Nunez, M. Oren, J. Penninger, S. Pervaiz, M.E. Peter, M. Piacentini, J.H. Prehn, H. Puthalakath, G.A. Rabinovich, R. Rizzuto, C.M. Rodrigues, D.C. Rubinsztein, T. Rudel, L. Scorrano, H.U. Simon, H. Steller, J. Tschoop, Y. Tsujimoto, P. Vandenabeele, I. Vitale, K.H. Vousden, R.J. Youle, J. Yuan, B. Zhivotovsky, and G. Kroemer, *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes*. *Cell Death Differ*, 2009. **16**(8): p. 1093-107.
255. Smith, T.W., *Digitalis. Mechanisms of action and clinical use*. *N Engl J Med*, 1988. **318**(6): p. 358-65.
256. Perne, A., M.K. Muellner, M. Steinrueck, N. Craig-Mueller, J. Mayerhofer, I. Schwarzingler, M. Sloane, I.Z. Uras, G. Hoermann, S.M. Nijman, and M. Mayerhofer, *Cardiac glycosides induce cell death in human cells by inhibiting general protein synthesis*. *PLoS One*, 2009. **4**(12): p. e8292.
257. Prassas, I. and E.P. Diamandis, *Novel therapeutic applications of cardiac glycosides*. *Nat Rev Drug Discov*, 2008. **7**(11): p. 926-35.
258. Wade, O.L., *Digoxin 1785-1985. I. Two hundred years of digitalis*. *J Clin Hosp Pharm*, 1986. **11**(1): p. 3-9.
259. Kinne-Saffran, E. and R.K. Kinne, *Herbal diuretics revisited: from "wise women" to William Withering*. *Am J Nephrol*, 2002. **22**(2-3): p. 112-8.
260. Mijatovic, T., E. Van Quaquebeke, B. Delest, O. Debeir, F. Darro, and R. Kiss, *Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1776**(1): p. 32-57.
261. Newman, R.A., P. Yang, A.D. Pawlus, and K.I. Block, *Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents*. *Mol Interv*, 2008. **8**(1): p. 36-49.
262. Abarquez, R.F., Jr., *The old but reliable digitalis: persistent concerns and expanded indications*. *Int J Clin Pract*, 2001. **55**(2): p. 108-14.

263. Winnicka, K., K. Bielawski, and A. Bielawska, *Cardiac glycosides in cancer research and cancer therapy*. Acta Pol Pharm, 2006. **63**(2): p. 109-15.
264. Schatzmann, H.J. and B. Rass, [*Inhibition of the active Na-K-transport and Na-K-activated membrane ATP-ase of erythrocyte stroma by ouabain*]. Helv Physiol Pharmacol Acta, 1965. **65**(1): p. C47-9.
265. Martins, I., O. Kepp, F. Schlemmer, S. Adjemian, M. Tailler, S. Shen, M. Michaud, L. Menger, A. Gdoura, N. Tajeddine, A. Tesniere, L. Zitvogel, and G. Kroemer, *Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress*. Oncogene, 2011. **30**(10): p. 1147-58.
266. Zhivotovsky, B. and S. Orrenius, *Calcium and cell death mechanisms: a perspective from the cell death community*. Cell Calcium, 2011. **50**(3): p. 211-21.
267. Xu, Z.W., F.M. Wang, M.J. Gao, X.Y. Chen, N.N. Shan, S.X. Cheng, X. Mai, G.H. Zala, W.L. Hu, and R.C. Xu, *Cardiotonic steroids attenuate ERK phosphorylation and generate cell cycle arrest to block human hepatoma cell growth*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2011. **125**(3-5): p. 181-91.
268. Tailler, M., L. Senovilla, E. Lainey, S. Thepot, D. Metivier, M. Sebert, V. Baud, K. Billot, P. Fenaux, L. Galluzzi, S. Boehrer, G. Kroemer, and O. Kepp, *Antineoplastic activity of ouabain and pyrithione zinc in acute myeloid leukemia*. Oncogene, 2011.
269. Huang, W.W., J.S. Yang, S.J. Pai, P.P. Wu, S.J. Chang, F.S. Chueh, M.J. Fan, S.M. Chiou, H.M. Kuo, C.C. Yeh, P.Y. Chen, M. Tsuzuki, and J.G. Chung, *Bufalin induces G(0)/G(1) phase arrest through inhibiting the levels of cyclin D, cyclin E, CDK2 and CDK4, and triggers apoptosis via mitochondrial signaling pathway in T24 human bladder cancer cells*. Mutat Res, 2012. **732**(1-2): p. 26-33.
270. Ramirez-Ortega, M., V. Maldonado-Lagunas, J. Melendez-Zajgla, J.F. Carrillo-Hernandez, G. Pastelin-Hernandez, O. Picazo-Picazo, and G. Ceballos-Reyes, *Proliferation and apoptosis of HeLa cells induced by in vitro stimulation with digitalis*. Eur J Pharmacol, 2006. **534**(1-3): p. 71-6.
271. Juncker, T., C. Cerella, M.H. Teiten, F. Morceau, M. Schumacher, J. Ghelfi, F. Gaascht, M. Schnekenburger, E. Henry, M. Dicato, and M. Diederich, *UNBS1450, a steroid cardiac glycoside inducing apoptotic cell death in human leukemia cells*. Biochem Pharmacol, 2011. **81**(1): p. 13-23.
272. Kometiani, P., L. Liu, and A. Askari, *Digitalis-induced signaling by Na⁺/K⁺-ATPase in human breast cancer cells*. Mol Pharmacol, 2005. **67**(3): p. 929-36.
273. Bielawski, K., K. Winnicka, and A. Bielawska, *Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of breast cancer MCF-7 cells by ouabain, digoxin and proscillaridin A*. Biol Pharm Bull, 2006. **29**(7): p. 1493-7.
274. Lopez-Lazaro, M., N. Pastor, S.S. Azrak, M.J. Ayuso, C.A. Austin, and F. Cortes, *Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients*. J Nat Prod, 2005. **68**(11): p. 1642-5.
275. McConkey, D.J., Y. Lin, L.K. Nutt, H.Z. Ozel, and R.A. Newman, *Cardiac glycosides stimulate Ca²⁺ increases and apoptosis in androgen-independent, metastatic human prostate adenocarcinoma cells*. Cancer Res, 2000. **60**(14): p. 3807-12.
276. Huang, Y.T., S.C. Chueh, C.M. Teng, and J.H. Guh, *Investigation of ouabain-induced anticancer effect in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells*. Biochem Pharmacol, 2004. **67**(4): p. 727-33.
277. Yeh, J.Y., W.J. Huang, S.F. Kan, and P.S. Wang, *Effects of bufalin and cinobufagin on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells*. Prostate, 2003. **54**(2): p. 112-24.
278. Newman, R.A., P. Yang, W.N. Hittelman, T. Lu, D.H. Ho, D. Ni, D. Chan, M. Vijjeswarapu, C. Cartwright, S. Dixon, E. Felix, and C. Addington, *Oleandrin-mediated oxidative stress in human melanoma cells*. J Exp Ther Oncol, 2006. **5**(3): p. 167-81.
279. Newman, R.A., Y. Kondo, T. Yokoyama, S. Dixon, C. Cartwright, D. Chan, M. Johansen, and P. Yang, *Autophagic cell death of human pancreatic tumor cells mediated by oleandrin, a lipid-soluble cardiac glycoside*. Integr Cancer Ther, 2007. **6**(4): p. 354-64.
280. Mijatovic, T., A. Op De Beeck, E. Van Quaquebeke, J. Dewelle, F. Darro, Y. de Launoit, and R. Kiss, *The cardenolide UNBS1450 is able to deactivate nuclear factor kappaB-mediated cytoprotective effects in human non-small cell lung cancer cells*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(2): p. 391-9.
281. Frese, S., M. Frese-Schaper, A.C. Andres, D. Miescher, B. Zumkehr, and R.A. Schmid, *Cardiac glycosides initiate Apo2L/TRAIL-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells by up-regulation of death receptors 4 and 5*. Cancer Res, 2006. **66**(11): p. 5867-74.
282. Kulikov, A., A. Eva, U. Kirch, A. Boldyrev, and G. Scheiner-Bobis, *Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(7): p. 1691-702.
283. Haux, J., *Digitoxin is a potential anticancer agent for several types of cancer*. Med Hypotheses, 1999. **53**(6): p. 543-8.

284. Joshi, A.D., D.W. Parsons, V.E. Velculescu, and G.J. Riggins, *Sodium ion channel mutations in glioblastoma patients correlate with shorter survival*. *Mol Cancer*, 2011. **10**: p. 17.
285. Duprez, L., N. Takahashi, F. Van Hauwermeiren, B. Vandendriessche, V. Goossens, T. Vanden Berghe, W. Declercq, C. Libert, A. Cauwels, and P. Vandennebeele, *RIP kinase-dependent necrosis drives lethal systemic inflammatory response syndrome*. *Immunity*, 2011. **35**(6): p. 908-18.
286. Adams, K.F., Jr., M. Gheorghiade, B.F. Uretsky, J.H. Patterson, T.A. Schwartz, and J.B. Young, *Clinical benefits of low serum digoxin concentrations in heart failure*. *J Am Coll Cardiol*, 2002. **39**(6): p. 946-53.
287. Bosse, G.M. and T.M. Pope, *Recurrent digoxin overdose and treatment with digoxin-specific Fab antibody fragments*. *J Emerg Med*, 1994. **12**(2): p. 179-85.
288. Mijatovic, T., I. Roland, E. Van Quaquebeke, B. Nilsson, A. Mathieu, F. Van Vynckt, F. Darro, G. Blanco, V. Facchini, and R. Kiss, *The alpha1 subunit of the sodium pump could represent a novel target to combat non-small cell lung cancers*. *J Pathol*, 2007. **212**(2): p. 170-9.
289. Xie, Z. and T. Cai, *Na⁺-K⁺--ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function*. *Mol Interv*, 2003. **3**(3): p. 157-68.
290. Sreenivasan, Y., P.B. Raghavendra, and S.K. Manna, *Oleandrin-mediated expression of Fas potentiates apoptosis in tumor cells*. *J Clin Immunol*, 2006. **26**(4): p. 308-22.
291. Contreras, R.G., L. Shoshani, C. Flores-Maldonado, A. Lazaro, and M. Cereijido, *Relationship between Na⁽⁺⁾,K⁽⁺⁾-ATPase and cell attachment*. *J Cell Sci*, 1999. **112** (Pt 23): p. 4223-32.
292. Baudouin-Legros, M., F. Brouillard, D. Tondelier, A. Hinzpeter, and A. Edelman, *Effect of ouabain on CFTR gene expression in human Calu-3 cells*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003. **284**(3): p. C620-6.
293. Rajasekaran, S.A., L.G. Palmer, S.Y. Moon, A. Peralta Soler, G.L. Apodaca, J.F. Harper, Y. Zheng, and A.K. Rajasekaran, *Na,K-ATPase activity is required for formation of tight junctions, desmosomes, and induction of polarity in epithelial cells*. *Mol Biol Cell*, 2001. **12**(12): p. 3717-32.
294. Wang, L., B.A. Wible, X. Wan, and E. Ficker, *Cardiac glycosides as novel inhibitors of human ether-a-go-go-related gene channel trafficking*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007. **320**(2): p. 525-34.
295. Saunders, R. and G. Scheiner-Bobis, *Ouabain stimulates endothelin release and expression in human endothelial cells without inhibiting the sodium pump*. *Eur J Biochem*, 2004. **271**(5): p. 1054-62.
296. Abramowitz, J., C. Dai, K.K. Hirschi, R.I. Dmitrieva, P.A. Doris, L. Liu, and J.C. Allen, *Ouabain- and marinobufagenin-induced proliferation of human umbilical vein smooth muscle cells and a rat vascular smooth muscle cell line, A7r5*. *Circulation*, 2003. **108**(24): p. 3048-53.
297. Aydemir-Koksoy, A., J. Abramowitz, and J.C. Allen, *Ouabain-induced signaling and vascular smooth muscle cell proliferation*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(49): p. 46605-11.
298. Haas, M., H. Wang, J. Tian, and Z. Xie, *Src-mediated inter-receptor cross-talk between the Na⁺/K⁺-ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(21): p. 18694-702.
299. Daniel, D., C. Susal, B. Kopp, G. Opelz, and P. Terness, *Apoptosis-mediated selective killing of malignant cells by cardiac steroids: maintenance of cytotoxicity and loss of cardiac activity of chemically modified derivatives*. *Int Immunopharmacol*, 2003. **3**(13-14): p. 1791-801.
300. Lawrence, T.S., *Ouabain sensitizes tumor cells but not normal cells to radiation*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1988. **15**(4): p. 953-8.
301. Lin, Y., D.H. Ho, and R.A. Newman, *Human tumor cell sensitivity to oleandrin is dependent on relative expression of Na⁺, K⁺ -ATPase subunitst*. *J Exp Ther Oncol*, 2010. **8**(4): p. 271-86.
302. Lytton, J., J.C. Lin, and G. Guidotti, *Identification of two molecular forms of (Na⁺,K⁺)-ATPase in rat adipocytes. Relation to insulin stimulation of the enzyme*. *J Biol Chem*, 1985. **260**(2): p. 1177-84.
303. Ye, J., S. Chen, and T. Maniatis, *Cardiac glycosides are potent inhibitors of interferon-beta gene expression*. *Nat Chem Biol*, 2011. **7**(1): p. 25-33.
304. Ihenetu, K., R. Espinosa, R. de Leon, G. Planas, A. Perez-Pinero, and L. Waldbeser, *Digoxin and digoxin-like immunoreactive factors (DLIF) modulate the release of pro-inflammatory cytokines*. *Inflamm Res*, 2008. **57**(11): p. 519-23.
305. Gheorghiade, M., K.F. Adams, Jr., and W.S. Colucci, *Digoxin in the management of cardiovascular disorders*. *Circulation*, 2004. **109**(24): p. 2959-64.
306. Cerella, C., M. Dicato, and M. Diederich, *Assembling the puzzle of anti-cancer mechanisms triggered by cardiac glycosides*. *Mitochondrion*, 2012.
307. Stenkvist, B., E. Bengtsson, G. Eklund, O. Eriksson, J. Holmquist, B. Nordin, and S. Westman-Naeser, *Evidence of a modifying influence of heart glucosides on the development of breast cancer*. *Anal Quant Cytol*, 1980. **2**(1): p. 49-54.
308. Stenkvist, B., E. Bengtsson, O. Eriksson, J. Holmquist, B. Nordin, and S. Westman-Naeser, *Cardiac glycosides and breast cancer*. *Lancet*, 1979. **1**(8115): p. 563.

309. Stenkvist, B., E. Pengtsson, B. Dahlqvist, O. Eriksson, T. Jarkrans, and B. Nordin, *Cardiac glycosides and breast cancer, revisited*. N Engl J Med, 1982. **306**(8): p. 484.
310. Stenkvist, B., *Is digitalis a therapy for breast carcinoma?* Oncol Rep, 1999. **6**(3): p. 493-6.
311. Haux, J., O. Klepp, O. Spigset, and S. Tretli, *Digitoxin medication and cancer; case control and internal dose-response studies*. BMC Cancer, 2001. **1**: p. 11.
312. Platz, E.A., S. Yegnasubramanian, J.O. Liu, C.R. Chong, J.S. Shim, S.A. Kenfield, M.J. Stampfer, W.C. Willett, E. Giovannucci, and W.G. Nelson, *A novel two-stage, transdisciplinary study identifies digoxin as a possible drug for prostate cancer treatment*. Cancer Discov, 2011. **1**(1): p. 68-77.
313. Biggar, R.J., J. Wohlfahrt, A. Oudin, T. Hjulter, and M. Melbye, *Digoxin use and the risk of breast cancer in women*. J Clin Oncol, 2011. **29**(16): p. 2165-70.
314. Schioppa, T., R. Moore, R.G. Thompson, E.C. Rosser, H. Kulbe, S. Nedospasov, C. Mauri, L.M. Coussens, and F.R. Balkwill, *B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF-alpha during squamous carcinogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(26): p. 10662-7.
315. Galluzzi, L., E. Vacchelli, A. Eggermont, W.H. Fridman, J. Galon, C. Sautes-Fridman, E. Tartour, L. Zitvogel, and G. Kroemer, *Trial Watch: Adoptive cell transfer immunotherapy*. Oncoimmunology, 2012. **1**(3): p. 306-315.